

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

**Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины**

На правах рукописи

Егоров Владимир Валерьевич

**СТРУКТУРНЫЕ ПРЕДПОСЫЛКИ АМИЛОИДОГЕННОСТИ
МОДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ.**

03.00.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических
наук

Научный руководитель:
д.м.н. Шавловский М. М.

Санкт-Петербург – 2006

ОГЛАВЛЕНИЕ.

ВВЕДЕНИЕ.	6
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	11
1.1. Амилоидозы	11
1.2. Распространенные формы амилоидозов	13
1.2.1. Амилоидозы, связанные с фибрилlogenезом бета- амилоидного пептида (ABeta).	14
1.2.2. Амилоидозы, связанные с фибрилlogenезом транстиретина (ATTR).	15
1.2.3. Прионные заболевания (APrP).	16
1.2.4. Амилоидоз, связанный с фибрилlogenезом амилина (AIPrP)	17
1.2.5. Амилоидоз при болезни Паркинсона (Asyn).	17
1.3. Молекулярные механизмы дегенеративных процессов при амилоидозах.	18
1.3.1. Роль префибриллярных форм белков в патогенезе амилоидозов.	18
1.3.2. Роль фибрилл в патогенезе амилоидозов.	19
1.4. Морфология фибрилл.	20
1.4.1. Протофиламенты и фибриллы.	20
1.4.2.Сферулиты.	23
1.5. Связывание с красителями.	24
1.5.1. Конго красный.	24
1.5.2. Тиофлавин Т.	24
1.6. Образование фибрилл.	26
1.6.1.Основные этапы фибрилlogenеза.	26
1.6.2. Факторы, влияющие на фибрилlogenез.	27
1.7. Фолдинг и фибрилlogenез.	32
1.7.1. Аминокислотные замены, вызывающие изменения конформации белка.	32

1.7.2. Расплавленная глобула и фибриллогенез.	33
1.8.Ингибиторы фибриллогенеза.	36
1.8.1. Химические шапероны	36
1.8.2.Химические ингибиторы.	36
1.8.3.Пептидные ингибиторы.	37
1.9. Альфа-лактальбумин и лизоцим как модельные белки.	38
1.9.1. Лизоцим.	39
1.9.2. Альфа-лактальбумин.	42
1.10. Заключение.	44
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Материалы.	45
2.2.Выделение альфа-лактальбумина человека из молока.	45
2.3. Электрофорез белков в ПААГ.	46
2.4. Сканирующая зондовая (атомная силовая) микроскопия.	47
2.5. Гель-фильтрация.	48
2.6. Поиск мотивов в аминокислотных последовательностях.	49
2.7. Моделирование пространственной структуры пептидов <i>in silico</i>.	50
2.8. Докинг пептида ID.	52
2.9. Приготовление препаратов фибрилл пептидов.	53
2.10. Приготовление проб для измерения флуоресценции комплексов образцов с тиофлавином Т.	53
2.11. Электронная микроскопия фибрилл.	54
2.12. Измерение ферментативной активности лизоцима.	54
2.13. Получение фибрилл лизоцима и альфа-лактальбумина.	55

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	56
3.1.Зеркально-симметричные мотивы в последовательностях фибрилlogenных пептидов.	
3.2.Предсказание фибрилlogenной детерминанты инсулина	62
3.3.Определение потенциальных амилоидогенных детерминант в последовательностях альфа-лактальбумина.	63
3.4. Создание пептида на основе первичной структуры симметричного участка бета-домена альфа-лактальбумина.	66
3.5. Механизм участия зеркально-симметричного пептида в фибриллогенезе лизоцима.	79
3.6. Изучение влияния пептида NTQATNRNTD на фибрилlogenез лизоцима куриного яйца.	86
3.7. Заключение	91
ВЫВОДЫ	92
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

APP (Amyloid Peptide Precursor) – предшественник бета-амилоидного пептида

HAMLET - Human Alpha-lactalbumin Makes LEthal for Tumor cells –

альфа-лактальбумин, способный вызывать гибель раковых клеток

SDS – додецилсульфат натрия

ThT – thioflavine T (тиофлавин T)

TTR – транстиретин

а.о. – аминокислотные остатки

АСМ – атомная силовая микроскопия

АЛ – альфа-лактальбумин

БАП – бета-амилоидный пептид

ГА – генетические алгоритмы

ЗСМ – зеркально-симметричный мотив

МАЛ – мультимерный альфа-лактальбумин

ММ – молекулярная механика

ПСА – персульфат аммония

ПК – пентагональный компонент

САП – сывороточный амилоид Р

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

ЭМ – электронная микроскопия

WT – пептид GYDTQAIVENNESTEYG

ID – пептид GYDTQTVVNNNGHTDYG

HALF – пептид NTQATNRNTD

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность проблемы. Конформационные заболевания - это группа заболеваний, при которых нарушение нормальных физиологических и появление аномальных свойств белков связаны с изменением их пространственной структуры (Merlini, Belotti, 2003). Значительная часть конформационных болезней представляет собой различные типы амилоидозов. Возникновение амилоидозов связано с накоплением в различных органах и тканях нерастворимых фибриллярных форм белков. К амилоидозам относятся такие известные заболевания как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, прионные заболевания. При диабете типа 2 образование амилоида также является одним из звеньев патогенеза (Покровский и др., 2004).

Амилоидозы являются довольно распространенной группой заболеваний. Так, например, в настоящее время, болезнь Альцгеймера обнаружена у 12 млн. людей по всему миру (Merlini, Belotti, 2003). По различным данным, амилоидоз мозга гистохимически выявляется у 30-46% психически здоровых людей в возрасте старше 60 лет и у 80-100% людей старше 85 лет (Ойфа, 1987; Merlini, Belotti, 2003).

Несмотря на существенный прогресс в понимании механизмов формирования амилоидных отложений, до сих пор не существует эффективных средств для лечения амилоидозов. (Jakobson, 2004). Широкая распространенность этой группы заболеваний позволяет рассматривать проблему поиска ингибиторов фибриллогенеза как достаточно актуальную.

Кроме того, изучение аномального фибриллогенеза является важным для разработки новых наноматериалов на основе аномальных фибрилл (Mitraki et al., 2005; Velikov, 2005).

Цели исследования. Основной целью данной работы являлось изучение молекулярных механизмов аномального фибриллогенеза и разработка подходов для подавления амилоидогенности модельных белков.

Задачи исследования.

1. Провести анализ первичной структуры известных фибриллогенных пептидов *in silico*. Выявить закономерности первичной структуры, характерные для этой группы полипептидов.
2. Определить структуру потенциальных фибриллогенных детерминант модельных белков альфа-лактальбумина и лизоцима.
3. Рассчитать строение и синтезировать пептиды, содержащие потенциальную фибриллогенную детерминанту альфа-лактальбумина человека. Изучить фибриллогенные свойства такого пептида *in silico* и *in vitro*. Изучить влияние такого пептида на фибриллогенез альфа-лактальбумина.
4. Установить возможный механизм участия потенциальных амилоидогенных детерминант в фибриллогенезе.
5. Рассчитать строение и синтезировать пептид, потенциально способный влиять на фибриллогенез лизоцима куриного яйца. Экспериментально изучить его влияние на фибриллогенез этого белка.

Научная новизна полученных результатов. При анализе первичной структуры фибриллогенных пептидов впервые обнаружено наличие зеркально-симметричных мотивов. Предложен и синтезирован способный к фибриллогенезу пептид, гомологичный фрагменту альфа-лактальбуминов. С помощью компьютерного моделирования и изучения свойств фибрилл такого пептида охарактеризован механизм его фибриллогенеза. Показано влияние такого пептида на фибриллогенез альфа-лактальбумина. Установлена роль последовательности 35-51 а.о. в фибриллогенезе этого белка. Предложена стратегия для ингибирования образования префибриллярных форм белков. Установлен потенциальный механизм участия зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе. На основании такого механизма рассчитан и синтезирован пептид, идентичный участку последовательности лизоцима и способный оказывать влияние на фибриллогенез этого белка.

Научная и практическая значимость работы. Полученные результаты позволяют расширить представления о мотивах, участвующих в белок-белковых взаимодействиях, и предложить стратегию для создания пептидов, способных влиять на аномальный фибриллогенез белков. Такие пептиды могут послужить основой для создания терапевтических средств для борьбы с амилоидозами. Кроме того, полученные данные и разработанные методы моделирования *in silico* могут быть использованы для создания наноматериалов на основе фибриллогенных пептидов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В последовательностях модельных белков альфа-лактальбумина и лизоцима существуют зеркально-симметричные мотивы.

2. Пептид GYDTQAIVENNESTEYG, содержащий зеркально-симметричный мотив и совпадающий по первичной структуре с участком 35-51 а.о. бета-домена альфа-лактальбумина, содержит фибриллогенную детерминанту этого белка.

3. Пептид GYDTQTVVNNNGHTDYG, гомологичный зеркально-симметричному мотиву альфа-лактальбумина, также содержит фибриллогенную детерминанту этого белка и способен связываться с ним в соотношении 2:1.

4. Результаты компьютерного моделирования фибриллогенеза пептида GYDTQTVVNNNGHTDYG, подтверждены в экспериментах *in vitro*.

5. Постулирован механизм участия зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе белков. На основании такого механизма рассчитан пептид, способный влиять на аномальный фибриллогенез лизоцима.

Апробация результатов работы. Основные положения работы были представлены на 9-й и 10-й Пущинских международных школах-конференциях молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2005, 2006), на международных конференциях European Society of Human Genetics (Prague, Czech Republic, 2005, Amsterdam, The Netherlands, 2006), на 8- и 9-й Всероссийских медико-биологических конференциях молодых исследователей

«Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2005, 2006) на научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, 2005), на межвузовской научной конференции “XXXIV неделя науки СПбГТУ” (Санкт-Петербург, 2005), а также на конференции, посвященной 115-летию ГУ НИИЭМ РАМН (Санкт-Петербург, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 2 статьи и 7 тезисов докладов на Всероссийских и Международных конференциях.

Личный вклад соискателя. Соискателем были проведены: анализ литературы по теме исследования, планирование экспериментов, получение основной части результатов, написание статей и подготовка докладов на конференциях. Выделение и очистка белка, используемого в работе, получение фибрилл, подготовка образцов для электронной микроскопии, модификация существующих методов для атомной силовой микроскопии образцов, оптимизация условий для флуоресцентного анализа, электрофоретическое и хроматографическое разделение олигомерных форм белков. Также соискателем была осуществлена разработка алгоритмов оригинальных компьютерных программ, использованных в работе. Отработка алгоритмов и написание программ осуществлялись студентом Кафедры биофизики СПбГПУ Гармаев Ю.П. Электронная микроскопия проводилась в Лаборатории патоморфологии вирусных инфекций ГУ НИИ гриппа РАМН под руководством к.б.н. Сироткина А.К. и в Ботаническом институте РАН. Атомная силовая микроскопия осуществлялась в Лаборатории биофизики макромолекул ОМРБ ПИЯФ РАН под руководством к.ф.-м.н. Лебедева Д.В. Измерение спектров флуоресценции осуществлялось в ИВС РАН под руководством д.ф.-м.н. Паутова В.Д., в Отделе биохимии НИИЭМ РАМН под руководством Лозовского В.Т., а также в ИНЦ РАН под руководством д.ф.-м.н. Туроверова К. К. Измерение ферментативной активности лизоцима проводилось в Отделе общей патологии ГУ НИИЭМ РАМН под руководством к.б.н. Берлова М.Н.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы», включающий 120 иностранных и 18 отечественных источников. Диссертация изложена на 106 стр. Результаты представлены в 1 таблице и иллюстрированы 45 рисунками.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Амилоидозы.

Амилоидозы относятся к группе так называемых конформационных заболеваний, возникновение которых связано с изменениями конформации белка, приводящими к приобретению им новой или нарушению существующей функции (Merlini, Velotti, 2003). Изменение конформации белков при амилоидозах приводит к появлению у них способности к образованию нерастворимых, устойчивых к действию протеаз фибриллярных структур, так называемых аномальных или амилоидных фибрилл. В настоящее время известно более 60 белков и пептидов, способных образовывать такие фибриллы *in vitro*, с фибрилlogenезом 20 из них связано развитие амилоидозов. Чаще всего наблюдаются внеклеточные отложения фибрилл, однако, при некоторых формах амилоидозов, фибриллярные агрегаты белка обнаруживаются и внутри клеток (Lansbury, 1999). Внеклеточные отложения, содержащие фибриллы белка, называются амилоидными бляшками. Именно такие образования были впервые выявлены в тканях больного и описаны Вирховым в 1854 году. Так как обнаруженное вещество специфически окрашивалось йодом (подобно крахмалу), Вирхов ввел для его описания термин амилоид (amyloid, «сходный с крахмалом»). Отложения амилоида в тканях были обнаружены при различных заболеваниях, получивших общее название - амилоидозы. В 1864 году Фридрих и Кеккуле показали, что основным компонентом амилоида являются белки. В 1959 году при электронной микроскопии вещества амилоидных бляшек было установлено, что образующие его белки находятся в фибриллярном состоянии. До начала 70-х годов 20 века считалось, что амилоидные фибриллы, обнаруживаемые при различных заболеваниях, образованы одним и тем же белком (Hogwich, 2002), поэтому историческая система классификации амилоидозов была основана на локализации амилоидных отложений и на клинических проявлениях заболевания (Woo, 1996). В настоящее время установлено, что амилоидные отложения содержат около 90% основного белка, характерного только для данного типа заболевания и около 10% общих для всех

типов амилоидозов компонентов (Merlini, Belotti, 2003). Точная биохимическая идентификация амилоидогенных белков в составе амилоидных отложений позволила ввести современную классификацию амилоидозов, по которой формы заболевания различают по мажорному фибриллообразующему белку (Jakobson, 2004). Таким образом, выделяют двадцать типов амилоидозов. Для обозначения заболевания предложено использовать латинскую прописную А, за которой следует общепринятое короткое обозначение основного компонента амилоидных отложений, формирующихся при данном заболевании. Например, амилоидоз, связанный с фибриллогенезом лизоцима (Lys) обозначается как ALys (Perys et al., 1993). В таблице 1 приведены наиболее часто встречающиеся формы амилоидозов и белки, фибриллогенез которых связан с возникновением таких форм.

Помимо основного фибриллообразующего белка, все амилоидные отложения содержат также минорные компоненты.

Сывороточный амилоид Р. В составе амилоидных отложений этот белок (сывороточный амилоид Р (САП), белок, принадлежащий к классу пентраксинов) присутствует в виде так называемого пентагонального компонента (ПК). САП представляет приблизительно 5% всех белков амилоидных отложений. В экспериментах на животных было показано, что отсутствие САП снижает скорость образования амилоидных бляшек. При введении радиоактивно меченого САП пациентам с амилоидозами наблюдали накопление этого компонента в органах, где происходило образование амилоидных отложений, поэтому было предложено использовать этот белок при диагностике амилоидозов (Jakobson, 2004).

Аполипопротеин Е (ApoE). ApoE является компонентом всех типов амилоидных отложений. Роль ApoE в формировании амилоидных отложений в настоящее время неизвестна, хотя в нескольких работах показано, что наследование аллеля *apoE1* связано с повышенным риском развития болезни Альцгеймера и диабета типа 2 (Zekanowski et al., 2003; Покровский и др., 2004).

Таблица 1. Амилоидогенные белки при наиболее распространенных формах амилоидозов (Woo, 1996).

Мажорный белок фибрилл	Заболевания
Иммуноглобулины	Амилоидозы, сопровождающие воспалительные процессы, миеломы (AL (L – от Light chain of immunoglobulins))
Транстиретин	Семейные амилоидозы, кардиоамилоидозы (ATTR)
Бета-амилоидный пептид	Болезнь Альцгеймера (в том числе при синдроме Дауна) (ABeta)
Прионный белок	Болезнь Крейцфельд-Якоба, фатальная семейная бессонница, губчатая энцефалопатия (APrP)
Амилин (островковый амилоидный полипептид, Islet Amyloid Poly Peptide)	Инсулинома или диабет типа 2 (AIAPP)
Альфа-синуклеин	Болезнь Паркинсона (ASyn)

Протеогликаны. Протеогликаны обнаруживаются во всех типах амилоидных отложений. Роль их в амилоидогенезе пока не известна, однако показано, что такие соединения способны увеличивать скорость образования амилоидных фибрилл *in vitro* (Jakobson, 2004).

Другие белки.

В составе амилоидных отложений также обнаруживаются следовые количества фибронектина и убиквитина (Jakobson, 2004).

1.2. Распространенные формы амилоидозов.

Амилоидозы являются довольно распространенной группой заболеваний. Так, болезнь Альцгеймера выявлена в настоящее время у 12 млн. людей (Merlini, Berlotti, 2003), амилоидоз поджелудочной железы, связанный с фибриллогенезом амилина, является наиболее частым осложнением диабета типа 2. Периодически наблюдающиеся эпизоотии губчатой энцефалопатии у

рогатого скота наносят большой ущерб сельскому хозяйству и представляют собой потенциальную опасность для здоровья человека (Покровский и др., 2004). По различным данным, амилоидоз мозга гистохимически выявляется *ex vivo* у 80-100% людей старше 85 лет (Ойфа, 1987; Merlini, Berlotti, 2003).

1.2.1. Амилоидозы, связанные с фибриллогенезом бета-амилоидного пептида (ABeta). Бета-амилоидный пептид (БАП) - это полипептид протяженностью 39-42 а.о., являющийся одним из первых белковых компонентов, идентифицированных в составе амилоидной бляшки при болезни Альцгеймера. Для этого полипептида также было впервые показано, что в составе фибрилл основным элементом его вторичной структуры являются бета-тяжи. В связи с этим бета-амилоидный пептид и получил свое название (Koo et al., 1999).

Предшественником БАП является трансмембранный белок APP (Amyloid Peptide Precursor), синтезирующийся в клетках мозга. Функция этого белка в норме пока остается неизвестной. APP способен подвергаться воздействию протеолитических ферментов - секретаз, расщепляющих пептидную связь в трансмембранном домене этого белка. Такое расщепление приводит к появлению во внеклеточном пространстве способного к образованию фибрилл N-концевого участка APP протяженностью 39-42 а. о. Собственно этот отщепляемый фрагмент и носит название БАП.

Фибриллогенез БАП наблюдается при болезни Альцгеймера – нейродегенеративном заболевании, приводящем к тяжелой умственной деградации. Массовая гибель нейронов наблюдается на всех стадиях фибриллогенеза БАП (Покровский и др., 2004).

Протяженность БАП (39, 40 или 42 а.о.) зависит от положения сайта атаки секретаз, обусловленного наследованием одного из трех известных в настоящее время вариантов APP. Наиболее амилоидогенным является пептид протяженностью 42 а.о. Аминокислотные замены встречаются также и в последовательности самого БАП. С некоторыми из них также связывают тяжесть течения болезни Альцгеймера. Другие формы болезни Альцгеймера

связаны с нарушением регуляции функции секретаз и других ферментов, участвующих в процессинге APP (Massi et al., 2002).

Амилоидоз, связанный с фибриллогенезом БАП часто наблюдается также при синдроме Дауна. В этом случае возникновение амилоидоза вызвано с наличием у больных дополнительной копии хромосомы 21 (ген APP локализован в этой хромосоме) и повышенной продукцией APP (Jakobson, 2004).

1.2.2. Амилоидозы, связанные с фибриллогенезом транстиретина (ATTR). Транстиретин (преальбумин, TTR) - это гомотетрамер с молекулярной массой 54 кДа, синтезирующийся в печени и хорoidalном сплетении. Основными функциями TTR являются транспорт гормона тироксина и ретинол-связывающего белка (Koo et al., 1999). Четыре субъединицы TTR формируют цилиндрический канал, внутренняя часть которого способна связывать тироксин.

Существуют семейные и спорадические случаи ATTR. В гене *TTR* известно более 80 мутаций, приводящих к изменению аминокислотной последовательности этого белка. Из них более 60 точечных аминокислотных замен повышают его способность к формированию фибрилл (SWISS-PROT). Амилоидозы, связанные с наличием мутаций в гене *TTR*, наследуются по аутосомно-доминантному типу с различной пенетрантностью. Наиболее часто встречаются аминокислотные замены V30M (Португалия, Япония, Швеция) и V122I (3,9% афроамериканцев). Такие мутации в TTR приводят к накоплению амилоида в первую очередь в периферической нервной системе, сердце и желудочно-кишечном тракте (OMIMTTR).

Для фибриллогенеза TTR необходимо, чтобы произошла полная диссоциация тетрамера и утрата нативной конформации мономеров (Quintas et al., 2001; Merlini, Belotti, 2003). В опытах на клетках нейробластомы в культуре было показано, что максимальным токсическим действием обладают аномальные гексамеры TTR (Reixach et al., 2004).

Спорадические случаи ATTR наблюдаются только в сенильном возрасте. В этом случае амилоидные фибриллы образованы TTR, не несущим аминокислотных замен. По-видимому, причиной спорадического ATTR являются нарушения клеточной системы контроля фолдинга белка в сенильном возрасте, так как в опытах *in vitro* такой белок способен формировать фибриллы только при высоких концентрациях и низких значениях pH. Амилоидные отложения нормального TTR обнаруживаются *ex vivo* в сердечных клапанах более, чем у 25% людей старше 90 лет и иногда приводят к возникновению сенильных кардиоамилоидозов.

Единственным известным на данный момент эффективным способом лечения амилоидоза, связанного с наличием мутаций в транстиретине, является пересадка печени (Woo, 1996).

1.2.3. Прионные заболевания (APrP). Белок PrP (Prion Protein) приобретает способность к фибриллогенезу после конформационного изменения, происходящего при взаимодействии с таким же белком в амилоидогенной аномальной конформации. Несмотря на интенсивное изучение свойств этого белка, его функция в норме остается неясной (Покровский и др., 2004).

При инфекционных формах прионных заболеваний (болезнь Куру, губчатая энцефалопатия, скрэпи) инфекционной единицей является попадающий в организм белок в аномальной конформации. Передача заболевания может осуществляться как внутри одного вида, так и между видами, вследствие высокой консервативности последовательности PrP (Gasset et al., 1992). При наследственных формах (болезнь Крейцфельда-Якоба, фатальной семейной бессоннице) аномальный фибриллогенез PrP связан с наличием генетически обусловленных аминокислотных замен. В этом случае заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу. Было показано, что белок, несущий такие мутации, обладает повышенной склонностью к фибриллогенезу *in vitro* (Инге-Вечтомов, 2000).

1.2.4. Амилоидоз, связанный с фибриллогенезом амилина (A β APP).

Диабет типа 2 является наиболее распространенным конформационным заболеванием. Амилоидные отложения в поджелудочной железе описаны впервые более 100 лет назад и являются одним из наиболее частых осложнений при этом заболевании (Покровский и др., 2004). Амилоидообразующим белком при диабете типа 2 является IAPP (Islet Amyloid Polypeptide), также известный как амилин. Амилоидные отложения локализуются только между клетками, окружающими островки Лангерганса. Протяженность IAPP составляет 37 а.о. Этот белок секретируется бета-клетками поджелудочной железы вместе с инсулином как у больных диабетом, так и у здоровых людей. Предполагаемой функцией IAPP является регуляция секреции инсулина и модулирование его активности в гладкой мускулатуре (Jakobson, 2004). Для формирования амилоидных фибрилл необходима утрата нативной конформации IAPP. Причины, приводящие к такой конформационной перестройке, в настоящее время остаются невыясненными. Последовательность IAPP довольно консервативна, хотя известна аминокислотная замена (S20G), обнаруженная в японской популяции. Такая замена встречается у больных диабетом типа 2 более часто, чем у здоровых людей, однако при изучении *in vitro* было показано, что она не приводит к повышению амилоидогенности IAPP. Амилоидоз поджелудочной железы у лиц в сенильном возрасте, не страдающих диабетом типа 2, обнаруживается приблизительно у 15% обследованных (Покровский и др., 2004).

1.2.5. Амилоидоз при болезни Паркинсона (ASyn). При болезни Паркинсона в дофаминэргических нейронах наблюдаются внутриклеточные белковые включения, получившие название телец Леви. Мажорным компонентом телец Леви являются амилоидные фибриллы, образованные белком альфа-синуклеином. В норме альфа-синуклеин участвует в формировании синапсов.

В гене, кодирующем этот белок, известны две мутации, соответствующие заменам A30P и A53T, и являющиеся причиной наследственной

предрасположенности к болезни Паркинсона. В экспериментах *in vitro* показано, что такие аминокислотные замены приводят к повышенной амилоидогенности альфа-синуклеина (Kim et al., 2000; Yagi et al., 2005).

1.3. Молекулярные механизмы дегенеративных процессов при амилоидозах.

В настоящее время существуют две основные гипотезы, объясняющие дегенеративные процессы при амилоидозах. По одной из них причиной гибели клеток являются токсичные префибриллярные формы белка, способные неспецифически взаимодействовать с клеточными структурами (Bucciantini et al., 2004; Sousa et al., 2001), по другой – патологический процесс связан со свойствами уже сформировавшихся фибрилл (Lansbury, 1999).

1.3.1. Роль префибриллярных форм белков в патогенезе амилоидозов.

Изменение проницаемости клеточной мембраны. Для БАП, прионного белка, IAPP и лизоцима в опытах на культурах клеток было показано (Demigo et al., 2005), что образующиеся в процессе фибриллогенеза олигомерные формы этих белков способны изменять проницаемость клеточной мембраны для ионов Ca^{2+} , в то время как нативные и фибриллярные формы этих полипептидов не обладают такими свойствами.

Взаимодействие с митохондриями. В работе (Malisauskas et al., 2006) изучалось влияние фибрилл и префибриллярных олигомерных форм лизоцима лошади на культуры раковых клеток. Было показано, что именно префибриллярные формы способны индуцировать апоптоз, в то время как растворимая форма лизоцима и фибриллы лизоцима не оказывают такого действия. Известно, что олигомерные формы альфа-лактальбумина (АЛ), образующиеся в условиях, способствующих фибриллогенезу, также обладают проапоптотическими свойствами в отношении культур опухолевых клеток (Svensson et al., 2000, Svensson et al., 1999). В опытах, проведенных на изолированных митохондриях, было показано, что такие формы АЛ способны изменять проницаемость стенок митохондрий и способствовать

высвобождению цитохрома С. Появление цитохрома С в цитозоли может послужить сигналом к активации апоптотического пути гибели клетки. К сожалению, возможные механизмы доставки олигомеров АЛ внутрь клетки остаются невыясненными (Kohler et al., 2001).

Неспецифическое взаимодействие с рецепторами. Необходимая для амилоидогенеза потеря нативной конформации белка может привести к возникновению способности к неспецифическим взаимодействиям между интермедиатами фибриллогенеза и клеточными рецепторами, в том числе участвующими в регуляции клеточного цикла (Srisailam, 2003). Например способность к такому взаимодействию показана для неправильно сложенных мономеров TTR, образующихся на начальных стадиях фибриллогенеза этого белка. (Bucciani et al., 2004).

1.3.2. Роль фибрилл в патогенезе амилоидозов. В работе (Orazo et al., 2002) было показано, что БАП способен формировать олигомерные комплексы, содержащие медь-связывающий сайт, сходный по структуре с сайтом медь-цинковой супероксид-дисмутазы. Такие комплексы катализируют окисление Cu^{2+} молекулярным кислородом и тем самым приводят к образованию перекиси водорода. Для протекания этой реакции необходимо присутствие холестерина, витамина С, L-ДОФА и дофамина. Активность комплексов ингибируется антителами к БАП, хелаторами меди и цинком. Воздействие на клетку образующейся в этом процессе перекиси водорода, возможно, является, одним из ключевых звеньев патогенеза нейродегенеративных заболеваний, связанных с аномальным фибриллогенезом БАП. С другой стороны, было показано, что при прионных заболеваниях нейродегенерация может быть также связана с потерей антиоксидантной активности прионного белка, вызванной его переходом в нерастворимую форму (Brown, Sassoan, 2002).

Данные, полученные (Gaeta et al., 2005), свидетельствуют, что при развитии амилоидозов, связанных с фибриллогенезом прионного белка и альфа-синуклеина генерация цитотоксических свободных радикалов кислорода с участием ионов железа и меди также играет критическую роль. Были

предложены стратегии предупреждения нейродегенерации при этих заболеваниях с использованием хелаторов металлов.

Известно также наличие связи между тяжестью течения амилоидоза и наличием мутаций, приводящих к снижению активности специфических протеаз, способных *in vitro* осуществлять протеолиз фибрилл БАП (Leissring et al., 2003).

1.4. Морфология фибрилл.

Изучение фибриллогенеза амилоидогенных белков человека *in vivo* сопряжено с определенными сложностями, связанными с отсутствием в настоящее время возможности диагностики амилоидозов на ранних стадиях, а также с затруднениями морально-этического характера. В работе (Serpell et al., 2000) были сопоставлены результаты анализа структуры амилоидных фибрилл, выделенных из тканей больных *ex vivo* и фибрилл, образованных теми же белками *in vitro*. Результаты этого сопоставления показали идентичность фибрилл, полученных такими способами, и, следовательно, целесообразность изучения амилоидогенных свойств белков *in vitro*. Изложенные ниже литературные данные получены, в основном, при изучении структуры фибрилл *in vitro*.

1.4.1. Протофиламенты и фибриллы. Фибриллы, образованные различными белками, обладают сходной морфологией. В работе (Chamberlain et al., 2000) были сопоставлены результаты анализа морфологических особенностей фибрилл, образованных 11 различными белками и пептидами, в том числе БАП, амилином, TTR и лизоцимом. Изучение структуры фибрилл проводилось с помощью электронной и сканирующей зондовой (атомной силовой) микроскопии. Фибриллы, образованные различными белками, имеют диаметр от 5 до 150 нм, причем диаметр фибриллы зависит от условий фибриллогенеза. При исследовании тонкой структуры фибрилл было показано, что фибрилла образуется из левозакрученных протофиламентов, диаметр которых составляет 2-5 нм и слабо зависит от условий фибриллогенеза.

Диаметр протофиламента зависит от количества бета-слоев, участвующих во взаимодействиях, определяющих фибрилlogenез, и практически не зависит от числа аминокислотных остатков в последовательности фибрилlogenного белка (Chamberlain et al., 2000). Сходные данные были получены при изучении поперечных срезов фибрилл методом криоэлектронной микроскопии (рисунок 1.1) (Serpell et al., 2000).

В работе (Sunde et al., 1997) приведены результаты исследования малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на фибриллах, образованных 10 различными белками и пептидами. Для всех объектов наблюдались практически идентичные паттерны рассеяния, что свидетельствует о сходстве структурных элементов, лежащих в основе фибрилlogenеза различных белков. На рисунке 1.2 представлен такой типичный паттерн. Различия наблюдались только в добавочных линиях, соответствующих рассеянию на более крупных объектах, соответствующих различным типам укладки протофиламентов. Анализ таких характерных для фибрилл паттернов позволил предложить общую структуру протофиламента.

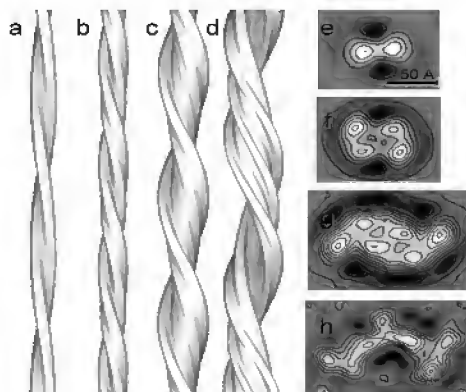


Рисунок 1.1. Данные о структуре фибрилл, полученные с помощью криоэлектронной микроскопии (*a,b,c,d*) – реконструкции структуры фибрилл, соответствующих срезам (*e,f,g,h*) – соответственно. (Serpell et al., 2000).

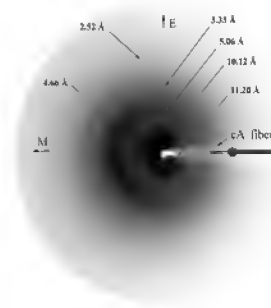


Рисунок 1.2. Типичный паттерн малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на фибриллах. Указана линия (*cA fiber*), соответствующая рассеянию на линейно расположенных альфа-углеродных атомах (Sunde et al., 1997).

Основным структурным элементом протофиламента являются бета-слои, ориентированные перпендикулярно оси фибриллы. Помимо характерного для бета-слоев закручивания, присутствует суперскрученность фибриллы с шагом спирали, соответствующим числу бета-тяжей, приходящемуся на ее виток. На рисунке 1.3 представлена реконструкция структуры фибриллы по данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

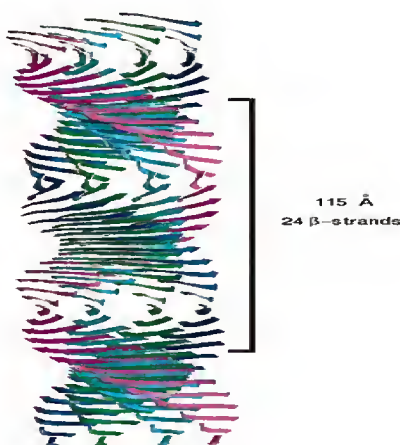


Рисунок 1.3. Реконструкция структуры фибриллы, полученная при анализе данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (Jimenez et al., 2002).

Результаты сопоставления спектров кругового дихроизма, а также инфракрасных спектров полипептидов в нативном состоянии и в составе амилоидных фибрилл свидетельствуют о том, что, вне зависимости от вторичной структуры фибриллообразующего белка, в процессе фибриллогенеза

белок приобретает преимущественно бета-структуру. (Zandomeneghi et al., 2004; McAllister, 2005).

1.4.2. Сферулиты. Было показано, что в процессе фибриллогенеза многие белки способны образовывать макроструктуры, состоящие из фибрилл. При изучении таких структур с помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что они представляют собой ядро из нерегулярных агрегатов белка, окруженное радиально ориентированными амилоидными фибриллами, так называемые «сферулиты». На рисунке 1.4. представлены данные о структуре сферулитов.

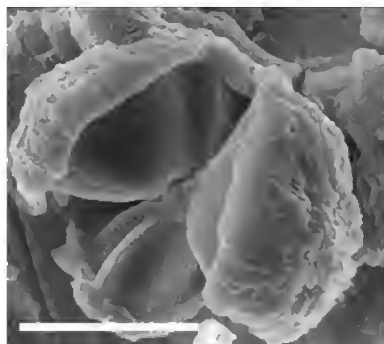


Рисунок 1.4 Структура сферулита. Данные сканирующей электронной микроскопии. Белый прямоугольник соответствует 2 мкм (Krebs et al., 2005(б)).

Известно, что сферулиты могут быть образованы такими молекулами как полиэтилен, синтетическая целлюлоза, хитин, хитозан, амилоза, лизоцим и карбоксипептидаза при условиях кристаллизации, бактериохлорофилл и мутантный вариант гемоглобина, встречающийся при серповидной клеточной анемии. Отложения сферулитов были обнаружены также в опухолях молочной железы у собак. Сферулиты обнаруживаются в ядре амилоидных бляшек при болезни Крейцфельда-Якоба, болезни Альцгеймера и синдроме Дауна. Также *in vitro* было показано, что сферулиты образуются при фибриллогенезе легкой цепи иммуноглобулинов, бета-амилоидного пептида, бета-лактоглобулина, инсулина и многих синтетических пептидов (Krebs et al. 2004(a), 2005(б)).

1.5. Связывание с красителями.

Сходство пространственной структуры амилоидных фибрилл проявляется также в их способности связывать одни и те же красители. В настоящее время для детекции фибрилл чаще всего применяются красители Конго красный и тиофлавин Т (ThT). Для окраски гистологических срезов также возможно использование тиазинового красного, тиофлавина S и йода (Ойфа, 1987; Лилли, 1969).

1.5.1. Конго красный. При изучении срезов мозга с помощью световой микроскопии было обнаружено, что амилоидные отложения окрашиваются Конго красным. При освещении окрашенной Конго красным пробы поляризованным светом наблюдается двойное зеленое лучепреломление. *In vitro* при связывании Конго красного с аномальными фибриллами спектр поглощения этого красителя меняет форму, при этом максимум поглощения сдвигается в более длинноволновую область. В работе (Stopa et al., 2003) было показано, что в образовании комплекса Конго красного с амилоидными фибриллами большую роль играют олигомеры, образованные молекулами этого красителя. Структура сферулитов, образующихся в процессе фибриллогенеза, позволяет объяснить характерную форму паттерна, наблюдающегося при микроскопии комплексов Конго красного с фибриллами в поляризованном свете (крестообразный паттерн). Периодичность расположения детерминантов связывания Конго красного в фибриллах приводит к упорядочению молекул красителя и возникновению двойного лучепреломления при освещении комплексов поляризованным светом.

1.5.2. Тиофлавин Т. При связывании ThT с амилоидными фибриллами происходит резкое увеличение квантового выхода флуоресценции этого красителя (LeVine III, 1993). Интенсивность флуоресценции ThT в определенном диапазоне пропорциональна количеству связавших его фибрилл, поэтому тиофлавин применяется как для качественной детекции фибрилл, так и для количественных измерений при изучении динамики фибриллогенеза. Максимальная интенсивность флуоресценции ThT различна для фибрилл,

образованных различными белками; условия достижения максимума также зависят от конкретного амилоидогенного белка (LeVine III, 1995). При изучении комплексов ThT с амилоидными фибриллами было показано, что молекула ThT присоединяется к стопке бета-слоев, являющихся основным структурным элементом фибриллы перпендикулярно их направлению (рисунок 1.5) (Krebs et al., 2005(a)).

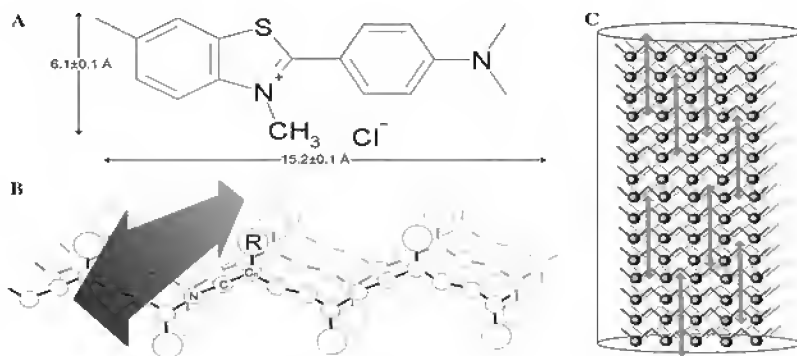


Рисунок 1.5. Связывание ThT с амилоидными фибриллами. (A) – структура молекулы ThT, (B) – расположение молекулы ThT относительно стопки бета-слоев, (C) – Расположение молекулы ThT относительно структуры фибриллы (Krebs et al., 2005(a)).

Был предложен механизм, обуславливающий увеличение квантового выхода флуоресценции при образовании комплекса ThT с амилоидными фибриллами. Молекула ThT состоит из двух колец – бензотиазолина и N,N-диметиланилина, соединенных одинарной связью. В несвязанном состоянии в растворе может происходить вращение колец вокруг этой связи. В этом случае поглощение кванта энергии диметиланилиновым кольцом приводит к рассеянию энергии на колебательные степени свободы и, как следствие, к низкому квантовому выходу флуоресценции (LeVine III, 1995, Воропай и др., 2003, Krebs et al., 2005(a)). Значительное возрастание квантового выхода флуоресценции ThT при его встраивании в амилоидные фибриллы вызвано затруднениями изменения взаимной ориентации фрагментов молекулы, возникающими при образовании комплекса. Увеличение жесткости окружения приводит к уменьшению числа колебательных степеней свободы молекулы в возбужденном состоянии и

способствует переносу энергии между диметиланилиновым и бензотиазолным кольцами (Воропай и др., 2003, Маскевич и др., 2004).

1.6. Образование фибрилл.

1.6.1. Основные этапы фибриллогенеза. Скорость образования фибрилл *in vitro* зависит как от белка, образующего фибриллы, так и от условий фибриллогенеза. Однако эксперименты по изучению изменению флуоресценции ThT и измерению спектров кругового дихроизма в процессе фибриллогенеза различных белков позволили выделить три общие стадии формирования фибрилл.

Лаг-фаза. Белок, помещенный в условия, приводящие к фибриллогенезу, образует неупорядоченные агрегаты, не способные связывать ThT. В молекулах возрастает количество бета-слоев. (Zandomeneghi et al., 2004; Merlini, Belotti, 2003).

Фаза роста фибрилл. На данной стадии наблюдается образование фибриллярных агрегатов (протофиламентов), объединяющихся в фибриллы и структуры более высокого порядка. При добавлении такого раствора в буфер, содержащий ThT, наблюдается рост флуоресценции этого красителя, что свидетельствует о возрастании количества структур, способных его связывать (LeVine III, 1995). Продолжительность лаг-фазы и фазы роста может варьировать в зависимости от белка и условий фибриллогенеза и составляет от нескольких секунд в случае некоторых фибриллогенных пептидов и мутантных форм TTR, до нескольких суток или даже месяцев.

Стационарная фаза. Большая часть молекул белка присутствует в составе фибрилл. Количество структур, способных связывать ThT, остается постоянным. При изучении фибриллогенеза SH3 домена альфа-субъединицы фосфотидилинозитол-3'-киназы быка было установлено, что ансамбль молекул белка в составе фибриллы находится в динамическом равновесии с пулом мономеров белка, присутствующих в растворе. Было показано, что часть потенциально способных к замещению водорода на дейтерий функциональных

групп молекул белка в составе фибриллы не способны к такому обмену, по-видимому, в силу недоступности таких групп для растворителя. Масс-спектрометрия молекул белка, составляющих фибриллы, находившиеся в контакте с D₂O в течение различных периодов времени, позволила изучить динамику обмена атомов водорода на атомы дейтерия. Математическая модель, описывающая такой процесс и полностью согласующаяся с экспериментальными результатами, свидетельствует в пользу существования следующего процесса: молекула белка выходит из фибриллы в раствор, где происходит быстрое замещение всех атомов водорода на дейтерий, после чего молекула снова присоединяется к фибрилле (Carulla et al., 2005). Наличие такого динамического равновесия может привести к постоянному присутствию вблизи амилоидных фибрилл способных к токсическому воздействию на клетку ненативных конформаций белка.

1.6.2. Факторы, влияющие на фибрилlogenез. Основными факторами, влияющими на фибрилlogenез, являются концентрация белка, pH среды, концентрация солей, температура и давление, при которых происходит этот процесс.

Концентрация белка. В работе (Lomakin et al., 1997) подробно рассмотрено влияние концентрации БАП на фибрилlogenез. Эксперименты по влиянию концентрации на фибрилlogenез других белков (Hall et al., 2005) свидетельствуют об общности обнаруженных для БАП закономерностей. Было показано, что при определенных условиях и концентрации больше величины $C_{\text{критическое}}$, характерной для каждого фибрилlogenного белка или пептида, в растворе образуются мицеллярные структуры, находящиеся в динамическом равновесии с мономерами пептида. Такие мицеллы являются областями локального повышения концентрации мономеров, в которых происходит образование так называемые ядер фибрилlogenеза (точек нуклеации). В точках нуклеации образуются протофибриллы, способные присоединять момеры пептида. При концентрациях меньше $C_{\text{критическое}}$ для фибрилlogenеза необходимо добавление уже существующих ядер фибрилlogenеза (рисунок

1.6). Была предложена математическая модель, использующая такие предположения в качестве исходных. Результаты, полученные в рамках этой модели для концентраций как больше, так и меньше $C_{\text{критическое}}$, совпадают с результатами экспериментов по изучению динамики фибриллогенеза бета-амилоида *in vitro*.



Рисунок 1.6. Схема фибриллогенеза по Lomakin et al., 1997 C -концентрация, c^* - $C_{\text{критическое}}$.

По-видимому, увеличение концентрации белка в растворе является необходимым условием для преодоления энергетического барьера между мономерной и необходимой для фибриллогенеза олигомерной формами белка.

pH среды. Изменение концентрации водородных ионов является важным фактором, влияющим как на скорость образования протофибрилл, так и на необходимое для образования зрелых фибрилл взаимодействие между протофибриллами. Как правило для начала фибриллогенеза необходимо понижение pH, приводящее к потере нативной структуры, но не вызывающее аморфной агрегации белка (McAllister et al., 2005). Некоторые точечные аминокислотные замены в TTR, лизоциме и альфа-синуклеине приводят к фибриллогенезу этих белков при физиологических значениях pH. Изменения пространственной структуры белка, вызываемые такими заменами сходны с изменениями, происходящими при изменении pH (Booth et al., 1997). По-видимому, основным эффектом pH, важным для фибриллогенеза белка, является дестабилизация взаимодействий, ответственных за поддержание нативной структуры белка. При изучении фибриллогенеза искусственных пептидов также была показана роль pH в изменении ионных взаимодействий

между боковыми цепями аминокислотных остатков. Возникающее электростатическое взаимодействие между мономерами приводит к сближению атомов азота и кислорода пептидных связей и таким образом способствует образованию бета-структур (Aggeli et al., 2003).

Низкие значения pH, необходимые для фибриллогенеза, присутствуют *in vivo* внутри лизосомы (Woo, 1996). Один из мажорных белков лизосом человека (LAMP1 - Lysosome Associated Membrane Protein) способен связывать тетрамер TTR, взаимодействуя с ним посредством С-конца. В работе (Chang et al., 2004) была высказана гипотеза, что таким образом в организме реализуется защита от аномального фибриллогенеза TTR.

Концентрация солей. Динамика фибриллогенеза и многие параметры формирующихся фибрилл, такие как средняя длина или число протофибрилл, образующих зрелую фибриллу, находятся в зависимости от ионной силы раствора. Для многих белков увеличение концентрации солей в растворе необходимо для инициации фибриллогенеза. По-видимому, повышение ионной силы раствора так же, как и изменение pH, дестабилизирует нативные внутримолекулярные взаимодействия (Sakurai et al., 2001). Концентрация соли играет определяющую роль и при формировании сферулитов. Так, в работе (Bromley et al., 2005) показано, что при низкой ионной силе образования сферулитов при фибриллогенезе бета-лактоглобулина, лизоцима и инсулина не происходит. Кинетика образования сферулитов сходна с кинетикой образования фибрилл: наблюдаются лаг-фаза, фаза роста и стационарная фаза. В течение лаг-фазы происходит образование ядра сферулитов, представляющего собой структуру из нерегулярных агрегатов белка. Высокая концентрация солей, по-видимому, влияет на соотношение скоростей процессов аморфной агрегации и фибриллогенеза, важное для этой стадии. Дальнейшая динамика роста количества фибрилл слабо отличается от поведения системы при низкой ионной силе. Во время фазы роста происходит увеличение длины фибрилл «растущих» из неупорядоченного ядра, о чем свидетельствуют данные, полученные с помощью сканирующей электронной

микроскопии. В стационарной фазе достигается максимум флуоресценции ThT, свидетельствующий об отсутствии увеличения количества фибрилл в растворе (Krebs et al. 2005(a,б)).

Температура и давление. Повышение температуры также является фактором, необходимым для фибриллогенеза большинства природных белков (Kamata et al., 2001). Увеличение давления и повышение температуры могут вносить вклад в стабилизацию ненативной конформации белка, необходимой для фибриллогенеза, за счет роста энтропийной составляющей свободной энергии молекулы.

Индукция фибриллогенеза. Еще одним фактором, существенно влияющим на кинетику фибриллогенеза *in vitro*, является наличие в растворе уже сформировавшихся ядер фибриллогенеза. Добавление фибрилл в раствор, в котором находится фибриллогенный белок, приводит к значительному сокращению или исчезновению лаг-фазы фибриллогенеза (Krebs et al., 2004(б)). Такая индукция ведет также к изменению необходимых для этого процесса условий, то есть часто при наличии затравки фибриллогенез может происходить при более низкой температуре, физиологических значениях pH и ионной силы раствора и концентрации фибриллогенного белка ниже $C_{\text{критическое}}$. *In vivo* сходные процессы являются основной причиной ненаследственных форм прионных заболеваний, например, губчатой энцефалопатии и болезни Куру. Причиной возникновения таких заболеваний является попадание в организм уже сформировавшихся фибрилл прионного белка и индукция образования фибрилл из молекул имеющегося в организме прионного белка в растворимой форме (Покровский и др., 2004). В работе (Krebs et al., 2004(б)) было показано, что *in vitro* в качестве затравки для фибриллогенеза какого-либо белка могут выступать только фибриллы, сформированные тем же белком. В частности, было показано, что фибриллы АЛ человека, лизоцима человека и инсулина быка не способны индуцировать фибриллогенез лизоцима куриного яйца. Максимально гомологичными лизоциму куриного яйца в этой группе является лизоцим человека - гомология между этими белками составляет 60%.

В то же время фибриллы лизоцима индейки (гомология 95%) способны индуцировать фибриллогенез лизоцима куриного яйца. Межвидовой барьер, наблюдаемый при передаче прионных заболеваний у млекопитающих и при индукции прионизации у дрожжей, по-видимому, также связан с межвидовыми различиями в первичной структуре прионных белков (Инге-Вечтомов, 2000).

Тот факт, что фибриллы одного белка, обладающего высокой степенью гомологии с другим белком, не способны индуцировать его фибриллогенез, позволяет предположить существование у таких белков различных амилоидогенных детерминант – участков пространственной структуры белка, играющих ключевую роль в межмолекулярных взаимодействиях при амилоидогенезе. Аминокислотные замены в таких участках могут, не оказывая существенного влияния на пространственную структуру и стабильность белка, влиять на его амилоидогенные свойства (Stopa et al., 2003; Ventura, 2005).

В настоящее время известен только один белок, затравкой для фибриллогенеза которого могут служить фибриллы, сформированы негомологичными белками. Фибриллы лизоцима, инсулина и шаперонина GroES увеличивают скорость формирования фибрилл альфа-синуклеина (Yagi et al., 2005).

Факторы, влияющие на фибриллогенез *in vivo*. При патогенезе амилоидозов на динамику фибриллогенеза оказывает влияние большое число факторов, остающихся за рамками исследований *in vitro*. В первую очередь следует отметить роль шаперонов в процессе фолдинга белка *in vivo*. *In vitro* процесс фибриллогенеза обычно происходит достаточно быстро, в то время как даже при наличии приводящих к наследственным формам амилоидозов мутаций развитие заболевания протекает в течение десятков лет. По видимому, система контроля фолдинга в клетке способствует удалению из клетки молекул белка в конформациях, способных к неспецифическим межмолекулярным взаимодействиям. Присутствие в составе амилоидной бляшке убиквитина в качестве минорного компонента может также косвенно свидетельствовать о наличии нарушений в системе шаперонов при развитии амилоидозов.

Еще одним фактором, влияющим на фолдинг *in vivo*, является высокая концентрация белков, не участвующих в фибриллогенезе непосредственно. Образование фибрилл уменьшает энтропию в клетке, однако в высоконасыщенном цитоплазматическом окружении удаление фибриллогенного белка из раствора может увеличить энтропию системы. Это может являться фактором, уменьшающим критическую концентрацию, необходимую для начала фибриллогенеза (Lansbury, 1999).

1.7. Фолдинг и фибриллогенез.

В процессе фолдинга молекула белка приобретает уникальную пространственную структуру, в то время как в процессе фибриллогенеза белки, отличающиеся по первичной и пространственной структуре, образуют практически идентичные фибриллы. Конформация белка, находящегося в составе фибриллы, является альтернативным нативному стабильным состоянием белка.

1.7.1. Аминокислотные замены, вызывающие изменения конформации белка. Изучение конформации белков в условиях, способствующих фибриллогенезу, показало, что основным результатом, общим для воздействия всех этих факторов на белок, является дестабилизация нативной структуры. Некоторые аминокислотные замены, являющиеся причиной наследственных форм амилоидозов и приводящие к фибриллогенезу белков *in vitro* даже при физиологических условиях, способствуют сходным изменениям нативной структуры. Например, для TTR известно более 60 аминокислотных замен, приводящих к повышению фибрилlogenности мутантного белка *in vitro* и наследственным амилоидозам. Эти замены распределены по аминокислотной последовательности белка практически равномерно, что свидетельствует об отсутствии роли большинства таких мутаций в формировании амилоидогенных детерминант. Изучение конформационных особенностей некоторых мутантных форм TTR показало, что конформации мутантного белка отличаются от нативной (Lansbury, 1999).

1.7.2. Расплавленная глобула и фибриллогенез. Как уже говорилось выше, в процессе формирования фибрилл белок приобретает преимущественно бета-структуру, стабилизирующуюся за счет межмолекулярных водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий. Основным действием факторов, способствующих фибриллогенезу, является дестабилизация нативного состояния белка, однако полная денатурация обычно приводит к аморфной агрегации молекул белка, но не к фибриллогенезу. Таким образом, для фибриллогенеза необходимо, чтобы в растворе присутствовало значительное число молекул в частично денатурированном состоянии, но при этом не должно происходить сильного нарушения внутримолекулярных взаимодействий (Hamada et al., 2002). Для многих белков, таких как АЛ, лизоцим и TTR было показано совпадение условий, приводящих к фибриллогенезу и условий, приводящих белок в состояние, близкое по вторичной структуре к нативному, но характеризующееся большим значением гидродинамического радиуса и повышенной подвижностью боковых цепей (Гильманшин и др., 1982; Booth et al., 1997, Hamada et al., 2002, Goers et al., 2002). Такие состояния, возникающие в процессе фолдинга или денатурации некоторых белков, получили название расплавленной глобулы. В состоянии расплавленной глобулы сохраняется большая часть нативных взаимодействий гидрофобной природы, однако утрачиваются специфические взаимодействия между боковыми радикалами аминокислотных остатков. Именно гидрофобные взаимодействия между областями белка, приобретающими в процессе фибриллогенеза бета-структуру, играют особую роль при формировании фибрилл (Hammarstorm et al., 1999; Merlini, Bellotti, 2003).

При фолдинге природных белков падение энтропии, сопровождающее этот процесс, должно полностью компенсироваться уменьшением свободной энергии за счет образования внутримолекулярных связей. Такой механизм обеспечивает быстрое приобретение полипептидной цепью стабильной нативной структуры, соответствующей минимуму свободной энергии (Финкельштейн, Птицын, 2002). Наличие состояний, соответствующих

локальному минимуму энергии, отделенному от соответствующего нативной конформации белка глобального минимума энергии энергетическим барьером может привести к уменьшению скорости фолдинга и возникновению неспецифических для нативного состояния межмолекулярных взаимодействий (рисунок 1.7). Такие взаимодействия способны привести к формированию агрегатов, в том числе и амилоидных фибрилл. В этом случае только наличие высокого энергетического барьера не позволяет белку в нативном состоянии достигать альтернативного энергетического минимума. Изменение условий среды способно привести к снижению такого барьера (Horwich, 2002).

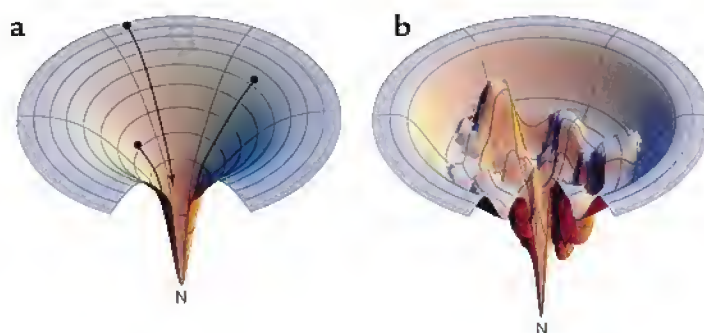


Рисунок 1.7. Энергетические профили складывания полипептидной цепи. А – складывание полипептидной цепи по принципу «все или ничего», между соседними энергетическими состояниями сворачивающейся цепи нет локальных минимумов. В – если на пути сворачивания присутствуют локальные минимумы (стабильные промежуточные состояния), белок может существовать в этом состоянии. (Финкельштейн, Птицын, 2002).

Агрегация белков обычно приводит к потере функций, поэтому в природных аминокислотных последовательностях наличие таких локальных минимумов встречается редко (Dobson, 1999). Единственным известным примером, когда функция белка связана с процессом, сходным с аномальным фибрилlogenезом, являются белки шелка насекомых (Hamodrakas et al., 2004). В то же время наличие множественных промежуточных состояний характерно для большого класса белков, участвующих в лиганд-рецепторном взаимодействии, так как отсутствие однозначно определенной конформации важно для

функционирования таких белков. Например, аполипопротеин A1 в отсутствие липидов теряет необходимую для связывания с рецептором структуру, но способен находиться в нескольких стабильных конформациях. Именно в таком состоянии этот белок способен образовывать фибриллы (Merlini, Bellotti, 2003). Отсутствие жесткой структуры также важно для взаимодействия легких цепей иммуноглобулинов с антигенами. Вариабельность легкой цепи также приводит к высокой вероятности амилоидогенности этого класса белков, что и наблюдается при амилоидозах AA (Selkoe et al., 2003). Интересен также факт способности к образованию фибрилл *in vitro* одним из факторов роста фибробластов (Srisailam et al., 2003), свидетельствующий о возможном сходстве структур, отвечающих за межмолекулярные взаимодействия при амилоидогенезе и взаимодействия с рецепторами, способными вызвать переход клетки на путь апоптоза.

Аминокислотные замены в последовательности белков, наблюдающиеся при наследственных формах амилоидозов, способствуют уменьшению энергетического барьера между нативным состоянием и состоянием, в котором белок способен участвовать в образовании амилоидных фибрилл (Horwich, 2002). Другие изменения первичной структуры могут привести к возникновению в последовательности пептида или на поверхности белка участков, способных к образованию межмолекулярных связей, также способных стабилизировать ненативные конформации белка (Kumagai, Kuwajima, 1995).

Способны влиять на величину энергетического барьера и ионы металлов, участвующие в стабилизации нативного или частично денатурированного состояния белка. Так, например, для перехода АЛ в состояние расплавленной глобулы достаточно удаления иона кальция, присутствующего в холоформе этого белка (Гильманшин и др., 1982), агрегация БАП в присутствии ионов меди способна происходить даже при небольшом изменении pH (Atwood et al., 1998), а присутствие ионов цинка в небольших концентрациях способствует фибриллогенезу инсулина (Покровский и др. 2004).

1.8. Ингибиторы фибриллогенеза.

К сожалению, в настоящее время не существует эффективных средств профилактики и терапии амилоидозов. Основные направления, по которым ведется поиск таких средств – это разработка соединений, способных предотвратить аномальный фибриллогенез полипептидов и/или избежать появления их префибриллярных олигомерных форм, токсичных для клетки.

1.8.1. Химические шапероны. Как уже говорилось выше, событием, необходимым для фибриллогенеза природного белка, является утрата белком его нативной конформации. В основу разработки так называемых «химических шаперонов» легла идея стабилизации нативной конформации белка за счет связывания с природным лигандом или его синтетическим аналогом (Bernier et al. 2004; Matsuda et al., 2003; Desnick, 2004). Известно, например, что тироксин способен выступать в качестве ингибитора фибриллогенеза транстиретина (Reixach et al., 2004). Был проведен поиск искусственных соединений, способных связываться с активным центром этого белка. При разработке таких ингибиторов активно использовались методы компьютерного моделирования, позволяющие вычислить сайты присоединения искусственных лигандов к транстиретину и оценить константы связывания. В результате этих исследований были синтезированы и изучены потенциальные ингибиторы фибриллогенеза транстиретина на основе дибензофуранов и производных феноксазина. Было показано, что такие соединения действительно ингибируют фибриллогенез, однако, вследствие высокой токсичности, для лечения амилоидозов они неприменимы (McPhee, Dobson, 2000).

1.8.2. Химические ингибиторы. Обсуждается возможность использования специфических красителей, способных связываться с фибриллами, в качестве ингибиторов фибриллогенеза. Так, было показано, что различные молярные соотношения между Конго красным и фибриллогенными белками способны по-разному воздействовать на фибриллогенез. В условиях для фибриллогенеза

легкой цепи иммуноглобулинов при соотношении ниже эквимольного Конго красный влиял на скорость фибриллогенеза, но не оказывал влияния на морфологию фибрилл. При 1.3-4.8-кратном избытке красителя помимо формирования фибрилл наблюдалось формирование аморфных агрегатов белка, при 8.8-кратном избытке наблюдалась утрата нативной конформации, но не агрегация белка. Предполагаемой причиной такого действия Конго красного является интеркаляция молекул красителя между бета-слоями, осуществляющаяся за счет π - π взаимодействий между его ароматическими группами и ароматическими аминокислотными остатками белка, а также ионные взаимодействия (Kim et al., 2003). К сожалению, большинство таких веществ являются мутагенами или токсичны.

1.8.3. Пептидные ингибиторы. В последнее время большие надежды возлагаются на пептидные ингибиторы фибриллогенеза. Одним из методов конструирования пептидных ингибиторов фибриллогенеза является создание искусственного полипептида, близкого по первичной структуре к амилоидогенному детерминанту белка, но содержащего добавочный участок, не обладающий ярко выраженной вторичной структурой или несущий заряд (Hall et al. 2005). Такой полипептид способен к конкурентному взаимодействию с амилоидогенным детерминантом, но не способен к присоединению следующего мономера. Например, присоединение пяти заряженных остатков R к N-концу пептида, полностью гомологичного амилоидогенной детерминанте инсулина привело к созданию ингибитора фибриллогенеза этого белка (Gibson, Murphy, 2006).

В случае известного амилоидогенного детерминанта, являющегося фрагментом бета-структуры, пептид, гомологичный такому участку, но несущий аминокислотные замены одного или двух гидрофобных аминокислотных остатков на заряженные может послужить в качестве так называемого «разрушителя бета-слоев». Будучи добавлен в раствор, где происходит фибриллогенез, такой пептид образует водородные связи с амилоидогенным детерминантом фибриллогенного белка, но препятствует

присоединению следующего мономера белка по механизму конкурентного связывания (Wang, Hecht, 2002).

Возможно создание пептидного ингибитора на основе последовательности природного белка, взаимодействующего с белком, способным к фибриллогенезу. Так предполагается, что в качестве пептидного ингибитора фибриллогенеза транстиретина может выступать фрагмент белка LAMP-1, способного связываться с этим белком и предотвращать его амилоидогенез при низких значениях pH (Chang et al., 2004).

Для разработки ингибитора фибриллогенеза белка G стрептококков была применена следующая стратегия. Вначале было проведено компьютерное моделирование взаимодействия двух бета-1-доменов этого белка с использованием программы для поиска наиболее энергетически выгодного взаимного расположения молекул в пространстве (докинга). На основании результатов моделирования было сделано предположение относительно аминокислотных остатков, играющих роль во взаимодействиях, обуславливающих олигомеризацию этого белка. Рекомбинантный белок, несущий аминокислотные замены в этих позициях, был способен выступать в качестве ингибитора фибриллогенеза белка G стрептококков *in vitro* (Shucua et al., 2004).

1.9. Альфа-лактальбумин и лизоцим как модельные белки.

Процесс аномального фибриллогенеза различных белков протекает сходным образом и подчиняется общим закономерностям. Поэтому в качестве моделей для разработки стратегии борьбы с амилоидозами могут быть использованы различные фибриллогенные белки. Лизоцим куриного яйца является одним из первых белков, для которых стала известна пространственная структура и механизм ферментативной активности, поэтому структурные особенности этого белка изучены довольно хорошо (Филлипс, 1968; Туроверов и др., 2001). В то же время фибриллогенез лизоцима человека,

высокогомологичного лизоциму куриного яйца, является причиной возникновения системных не нейропатических амилоидозов.

Альфа-лактальбумин является белком, для которого впервые было описано состояние молтен-глобулы. Для префибриллярных олигомеров этого белка характерны цитотоксические свойства, присущие префибриллярным формам белков, участвующих в патогенезе амилоидозов (Svensson et al., 2000; Merlini, Belotti, 2005). В то же время, альфа-лактальбумины и лизоцимы обладают сходной пространственной структурой, что позволяет проводить параллели между различиями в структуре этих белков и различием в их свойствах, проявляющихся в процессе фибриллогенеза.

1.9.1. Лизоцим. Лизоцим (ЕС 3.2.1.17) - это белок с молекулярной массой 14,6 кДа, состоящий из 129 аминокислотных остатков (а.о.). Лизоцим катализирует гидролиз бета (1-4) гликозидных связей между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином мукополисахаридов бактериальной стенки. В организме человека он был обнаружен в селезенке, легких, почках, лейкоцитах, молоке, слезах и слюне (OMIM LYS).

Пространственная структура лизоцима хорошо изучена и разработаны методы, позволяющие изучать изменение структуры лизоцима в различных условиях. Поэтому лизоцим является хорошей моделью для испытания *in vitro* новых фармакологических препаратов для борьбы с амилоидозами (Merlini, Belotti, 2005).

При изучении влияния pH и температуры на фибриллогенез лизоцима (Arnaudov, de Vries, 2005) было показано, что для образования фибрилл лизоцима человека и лизоцима куриного яйца *in vitro* необходимо повышение температуры до 55-65 °C и понижение pH до 2-2.5.

Амилоидозы, связанные с фибриллогенезом лизоцима (ALys) – это наследственные заболевания, передающиеся как аутосомно-доминантный признак. Аномальный фибриллогенез лизоцима приводит к системным не нейропатическим амилоидозам. У больных наблюдаются амилоидные отложения в сосудах, которые обычно приводят к смерти в пятой декаде жизни

(Woo, 1996). Также описано два случая вторичной открытоугольной глаукомы, при которых были обнаружены амилоидные отложения лизоцима в тканях глаза. (OMIMLYS).

Повышенная амилоидогенность лизоцима является следствием наличия аминокислотных замен в его последовательности. В настоящее время известны две такие замены (T56I и H67D). Фибриллы, полученные из тканей пациентов с ALys, содержали только мутантный белок, хотя больные являлись гетерозиготными носителями мутации (Pepys et al., 1993).

В работе (Booth et al., 1997) было показано, что соответствующие аминокислотным заменам T56I и H67D в последовательности лизоцима человека аминокислотные замены I55T и D66H в последовательности лизоцима куриного яйца вызывают повышение амилоидогенности этого белка *in vitro*. Такие изменения аминокислотной последовательности дестабилизируют пространственную структуру лизоцимов, и таким образом приводят к росту числа неправильно сложенных конформеров при физиологических условиях. Некоторые из этих конформеров способны взаимодействовать между собой с образованием фибрилл (Merlini, Belotti, 2003).

Изменение конформации лизоцима проявляется и в изменении числа аминокислотных остатков, доступных растворителю. В опытах с обменом дейтерия было показано, что обмен всех доступных протонов в мутантном белке происходит в течение минут, в то время как 55 таких протонов белка дикого типа не способны к обмену дейтерием со средой. В переходных состояниях, предшествующих фибриллогенезу лизоцима куриного яйца, альфа-домен этого белка остается структурированным, в то время как бета-домен теряет свою вторичную структуру. Поэтому было сделано предположение, что именно бета-домен играет ключевую роль в процессе фибриллогенеза (Hogwich, 2002). Это предположение подтверждается и результатами, полученными в работе (Krebs et al., 2000), где было показано, что фрагмент бета-домена лизоцима куриного яйца 49-63 а.о. (GSTDYGILQINSRWWS) способен формировать фибриллы.

Анализ дальнейших конформационных переходов лизоцима с помощью Рамановской спектроскопии в области дальнего УФ показал, что в течение первых 29 часов инкубации в концентрации 14 мг/мл при 65°C доля альфа-спиралей (32% в нативном состоянии) снижается до 6%. Также было показано, что одновременно с этим увеличивается доступность фенилаланинов растворителю (Xu et al. 2005a). Интересно, что при определенных условиях формирование фибрилл лизоцима куриного яйца может происходить даже при полном восстановлении дисульфидных связей в этом белке (Cao et al, 2004).

В работе (Malisauskas et al., 2006) показано, что префибриллярные формы лизоцима лошади способны вызывать гибель раковых клеток в культуре. Лизоцим из молока лошади наиболее близок по аминокислотной последовательности (около 80%) к лизоциму из молока осла и лизоциму из молока собаки. Такие лизоцимы способны связывать ион кальция, подобно лактальбуминам. В то же время, лизоцимы собаки, выделенные из молока и селезенки, гомологичны друг другу на 45% , при этом лизоцим из селезенки гомологичен на 83% лизоцимам других млекопитающих и птиц (лизозимов С-типа) и не способен связывать ион кальция (Grobler et al., 1994). В настоящее время токсичность префибриллярных форм лизоцимов, не способных связывать ион кальция, не показана.

В работе (Kuroki et al., 1989) с помощью сайт-направленного мутагенеза в последовательности лизоцима куриного яйца был создан Ca^{2+} -связывающий EF-hand мотив. Было показано, что лизоцим, несущий такие мутации способен сохранять ферментативную активность в присутствии связанного иона кальция при температуре 80°C, в то время как лизоцим дикого типа теряет активность при температуре выше 40°C. Таким образом, связывание иона кальция приводит к повышению стабильности структуры лизоцима.

Эволюционными предшественниками альфа-лактальбуминов являются кальций-связывающие лизоцимы, в свою очередь произошедшие от лизоцимов С-типа (Nitta et al., 1989). По-видимому, вначале произошла дупликация гена лизоцима, что привело к снижению давления отбора на мутации во второй

копии гена, так как для гуморальной защиты организмов от бактерий было достаточно одной копии (Shewale et al., 1984). Возникшие мутации привели к образованию сайта связывания кальция, а затем и к смене субстратной специфичности лизоцима и возникновению гена лактальбумина. (Hall et al., 1982; Prager et al., 1988).

1.9.2. Альфа-лактальбумин. Альфа-лактальбумин человека - это белок, состоящий из 123 а.о. и имеющий молекулярную массу 14076 Да (Permyakov, Berliner, 2000). АЛ является модифицирующей субъединицей лактозо-синтазы. Вторым компонентом лактозо-синтазы является галактозилтрансфераза. Сам по себе этот белок способен переносить галактозу с UDP-галактозы на N-ацетилглюкозамин. АЛ меняет специфичность галактозилтрансферазы, и лактозо-синтаза переносит галактозу не на N-ацетилглюкозамин, а на глюкозу, что приводит к образованию лактозы. Галактозилтрансфераза присутствует в большинстве органов и тканей, в то время как АЛ обнаруживается только в лактирующей молочной железе (Horwich, 2002). В настоящее время неизвестны патологические процессы, при которых происходит фибриллогенез АЛ.

АЛ является первым белком, для которого было обнаружено существование состояния расплавленной глобулы - состояния, при котором белок проявляет свойства, характерные как для нативной, так и для развернутой конформации (Гильманшин и др., 1982). При переходе в состояние расплавленной глобулы гидродинамический радиус молекулы АЛ увеличивается на 30%. Для расплавленной глобулы АЛ характерно наличие сходных с присутствующими в нативном состоянии водородных связей между пептидными группами (определяющих вторичную структуру) и гидрофобных контактов между боковыми цепями аминокислотных остатков. В то же время ослабляются вандер-ваальсово притяжение, водородные связи между боковыми группами и ионные взаимодействия. В опытах *in vitro* показано, что время перехода из полностью развернутой конформации в состояние расплавленной глобулы на три порядка превышает время перехода из состояния расплавленной глобулы в нативное состояние. Это свидетельствует о том, что промежуточная форма АЛ

лежит на «кинетическом пути» сворачивания развернутой цепи белка в нативную пространственную структуру (Финкельштейн, Птицын, 2004). Исследования температурного плавления АЛ показали, что переход в состояние расплавленной глобулы - это переход типа «все или ничего», то есть, по-видимому, существует энергетический барьер при переходе между нативной конформацией АЛ и расплавленной глобулой. При дальнейшей тепловой денатурации кооперативного плавления не происходит (Гильманшин и др., 1982).

АЛ переходит в состояние расплавленной глобулы при денатурирующих воздействиях (таких, как снижение pH до 2.4 и нагревание до 55 °C, а также при десорбции иона кальция молекулой белка (Гильманшин и др., 1982). Те же условия необходимы для фибриллогенеза АЛ. Интересно, что удаление участка 40-56 бета-домена при помощи ограниченного протеолиза не влияет на способность АЛ переходить в состояние расплавленной глобулы (Polverino de Laureto et al., 2001, 2002) и не влияет на способность этого белка к фибриллогенезу (Laureto et al., 2005).

В работе (Cawthern et al., 1997) было показано, что при удалении иона кальция АЛ быка способен взаимодействовать со стеариновой кислотой. На основании результатов этих экспериментов сделано предположение о наличии дополнительной функции АЛ, связанной с транспортом жирных кислот в молоке.

Комплекс (HAMLET) мультимеров АЛ человека с олеиновой кислотой (18:1) обладает бактерицидной активностью по отношению к *Streptococcus pneumonia* (Hakansson et al., 2000), а также способствует апоптозу раковых клеток в культуре (Svensson et al., 1999). Мультимерные комплексы АЛ человека (МАЛ, мультимерный лактальбумин, и HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Makes LEthal for Tumor cells)) способны изменять проницаемость мембран митохондрий. Взаимодействие таких комплексов с митохондриями печени крысы *in vitro* приводит к потере мембранного потенциала, набуханию митохондрий и высвобождению цитохрома С. Высвобождение цитохрома С

может привести к активации каспазного каскада и апоптозу клеток. Такое действие комплекса не связано с наличием жирных кислот, так как полное их удаление приводит к замедлению процесса, но не предотвращает его. По-видимому, олеиновая кислота необходима для образования мультимерных комплексов АЛ, но не входит в их состав (Kohler et al., 2001). Также на культурах клеток было показано, что при десорбции иона кальция АЛ человека способен связываться с гистонами (Durringer et al., 2003; Permyakov et al., 2005).

1.10. Заключение.

Несмотря на различия в структуре фибриллогенных белков, наблюдается сходство в механизмах, обуславливающих их фибриллогенез (Merlini, Belotti, 2003), поэтому выяснение таких механизмов, для ограниченной группы белков может привести к созданию стратегии для разработки средств, позволяющих бороться с амилоидозами.

Один из необходимых этапов создания средств для борьбы с амилоидозами – это разработка методов целенаправленного воздействия на участки белков, взаимодействующих в процессе формирования фибрилл (MacPhee, Dobson, 2000). Приведенные выше данные свидетельствуют в пользу того, что наиболее эффективным направлением поиска средств для борьбы с амилоидозами являются пептидные ингибиторы. Низкая токсичность и высокая специфичность воздействия таких соединений на фибриллогенные белки позволяет предположить, что именно на основе таких соединений будут созданы ингибиторы образования токсичных префибриллярных форм белков и фибриллогенеза. Альфа-лактальбумин человека и лизоцим куриного яйца способны образовывать аномальные фибриллы (Goers et al., 2002; Krebs et al., 2000). Пространственные структуры этих белков хорошо изучены, поэтому целесообразно использование этих белков в качестве моделей для изучения аномального фибриллогенеза (Merlini, Belotti, 2005) и разработки стратегии создания пептидных ингибиторов фибриллогенеза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы.

При выполнении работы использовали реактивы фирм «SIGMA» (Тиофлавин Т, NaN_3 , EDTA, фенил-сефароза, маркеры молекулярного веса, лизоцим куриного яйца, препарат клеточной стенки *M. luteus*), «SERVA» (реактивы для электрофореза и буферные растворы), «TOYOSODA» (смолы для гель-фильтрации), «MERCK» (неорганические соли). Пептиды GYDTQTVVNNNGHTDYG, GYDTQAIVENNESTEYG и NTQATNRNTD были синтезированы в ООО «НПФ «Верта», чистота препаратов превышала 90%. Для фильтрации образцов перед выполнением сканирующей зондовой микроскопии использовали фильтры фирмы «Orange scientific». Для сканирующей зондовой микроскопии использовали пластинки слюды фирмы «Structure Probe Inc.» и кантиливеры фирмы «NT-MDT». Также использовали стеклянные пластинки, покрытые HydroGel фирмы «Perkin-Elmer». Аминокислотные последовательности фибриллогенных пептидов и белков получены из баз данных GenBank (NCBI), SWISS-PROT (SWISSPROT), а также из статей (Azriel, Gazit, 2001; Liu et al., 2004; Tagliavini et al., 1993; Sedman et al., 2005; Jarvis et al., 1993; Krebs et al., 2000; Lopez de la Paz, 2002; Legman et al., 2004; Nelson et al., 2005).

2.2. Выделение альфа-лактальбумина человека из молока.

Альфа-лактальбумин выделяли из молока человека по методу, описанному в работе (Svensson et al., 2000). Грудное молоко третьего месяца лактации хранили не более 5 дней при $+4^{\circ}\text{C}$ (далее все процедуры вели при данной температуре) с добавлением NaN_3 до конечной концентрации 0.02%. К такому молоку (500 мл) добавляли сульфат аммония 264 г/литр, затем инкубировали при постоянном перемешивании в течение 12-14 часов. Центрифугировали при $5000g$ в течение 15 минут и надосадочную жидкость отбирали, лиофильно высушивали и растворяли полученный порошок в 500 мл буфера (50мМ Трис-HCl, pH 7.5, 35мМ ЭДТА). Далее проводили выделение альфа-лактальбумина

из полученного раствора с помощью гидрофобной хроматографии: белковый раствор наносили на колонку объемом 50 мл с фенил-сефарозой (скорость нанесения 1 мл/мин), уравновешенную буфером (50мМ Трис-HCl pH 7.5, 1мМ ЭДТА), затем производили отмывку колонки тем же буфером (50мМ Трис-HCl pH 7.5, 1мМ ЭДТА) до $A_{280} < 0.001$ в оттекающем с колонки растворе. Регистрацию проводили в проточной кювете с помощью системы фирмы LKB. Альфа-лактальбумин элюировали с колонки с помощью буфера (50мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1мМ CaCl_2). Контроль чистоты препарата проводили с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

2.3. Электрофорез белков в ПААГ.

А. Электрофорез в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970).

Подготовка образцов. Пробы для электрофореза готовили следующим образом: к 5 мкл белка с концентрацией около 1 мг/мл добавляли 5 мкл раствора, содержавшего 2% SDS, 2.5% бета-меркаптоэтанол и 0,01% бромфеноловый синий, затем инкубировали на кипящей водяной бане в течение 3 минут.

Электрофоретическое разделение в ПААГ. Электрофорез белка в 8% ПААГ осуществляли в пластинах с размерами 10×10 см при градиенте напряжения 20 В/см в геле следующего состава: 8% акриламид (акриламид/метиленбисакриламид=29:1), 37мМ Tris-HCl, pH 9.4, 0.01% SDS, 0.01% персульфат аммония, 0.001% тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) с использованием электродного буфера, содержащего 0.125 М Tris-HCl, pH 6.8 и 0.1% SDS.

Б. Диск-электрофорез в кислой системе (Маурер, 1971).

Подготовка образцов. К 3 мкл образца (15 мкг белка) добавляли 1 мкл буфера (60мМ KOH-CH₃COOH буфер, pH 6.7, 50% глицерин, 0.001% метиловый зеленый, 10% насыщенный спиртовой р-р пиронина G).

Электрофоретическое разделение в ПААГ. Электрофорез лизоцима, инкубировавшегося с пептидом и без пептида проводили с использованием

7.5% разделяющего ПААГ, содержащего KOH-CH₃COOH буфер, pH 4.3 (70мМ KOH, 2.5% CH₃COOH, 7.5% акриламид (акриламид/метиленбисакриламид=29:1), 0.01% персульфат аммония, 0.001% TEMED) и 5% концентрирующего ПААГ содержащего Tris-HCl буфер, pH 6.7 (40мМ KOH, 0.2% CH₃COOH, 5% акриламид (акриламид/метиленбисакриламид=29:1), 0.01% персульфат аммония, 0.001% TEMED). В качестве электродного использовали β-аланин-ацетатный буфер, pH 4.5 (β-аланин – 31.2 г, CH₃COOH - 8.01 мл, H₂O - до 1 л). Непосредственно перед употреблением исходный электродный буфер разводили в 10 раз дистиллированной водой. Электрофорез проводили в течение 3 часов при градиенте потенциала 15-20 В/см в аппарате для вертикального ЭФ.

Окрашивание белков в ПААГ с помощью нитрата серебра. После проведения электрофореза гель помещали на 1 час в 50 мл раствора для отмывки от SDS (50 мл 96% этанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты, 40 мл дистиллированной воды). При изучении электрофоретического разделения олигомеров пептида в 50 мл раствора добавляли также формальдегид до конечной концентрации 1% для фиксации мономеров пептида в геле. Затем помещали гель на 30 минут в 10% раствор (v/v) уксусной кислоты, после чего промывали гель дистиллированной водой 3 раза по 2 минуты. Помещали гель в 0.1% раствор AgNO₃ на 30 минут. Промывали гель дистиллированной водой в течение 20 секунд и помещали в проявитель (3% соды безводной, 0.1% формальдегида, 0.0001% тиосульфата Na). После проявления зон фиксировали гель в 10% растворе уксусной кислоты.

2.4. Сканирующая зондовая (атомная силовая) микроскопия.

Эксперименты проводили в Лаборатории биофизики макромолекул ОМРБ ПИЯФ РАН под руководством к.ф.-м.н. Д.В.Лебедева. Атомную силовую микроскопию (АСМ) проводили на микроскопе «Solver-bio» (NT-MDT, Зеленоград), смонтированном на инвертированном флуоресцентном

микроскопе «Olympus». Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантиливера NSG 01-03.

Сорбция фильтрованного раствора фибрилл на слюдяной подложке.

Раствор, содержащий фибриллы, разводили фильтрованной дистиллированной водой до конечной концентрации 0.03 мг/мл, затем полученный раствор с помощью шприца продавливали через 0.45 мкм фильтр на только что отделенную от блока слюдяную подложку. Также использовали слюдяные подложки, покрытые углеродной пленкой.

Сорбция фибрилл на поверхности гидрогеля.

50 мкл раствора, содержащего фибриллы (3 мг/мл), наносили на предметное стекло, покрытое гидрогелем и инкубировали в течение 30 минут. Не сорбировавшиеся агрегаты смывали проточной фильтрованной дистиллированной водой в течение 30 секунд. Затем наносили раствор, содержащий 250мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8.0 и 6 мкМ ThT. Инкубировали поверхность геля с таким раствором в течение 30 мин. Смывали проточной фильтрованной дистиллированной водой в течение 30 секунд, затем сушили при комнатной температуре в течение 12 часов. Первоначальное прицеливание зонда осуществляли по флуоресценции ThT с использованием флуоресцентной приставки к микроскопу.

Обработка результатов. Измерения параметров фибрилл проводили с помощью пакета программ NT-MDT Nova.

2.5. Гель-фильтрация.

Гель-фильтрацию олигомеров пептида осуществляли на колонке 1,5×15 см с TOYOPEARL HW-50, уравновешенной буфером 0.1 М Tris-HCl pH 7.5, 0.1 NaCl. Для предотвращения фиксации на колонке высокомолекулярных агрегатов пробу предварительно центрифугировали в течение 10 минут на центрифуге «Eppendorf» при 13400 об/мин. Супернатант наносили на колонку при скорости элюирования 1 мл/мин. Регистрацию проводили с помощью системы Uvicord фирмы LKB. Колонка калибровалась с помощью стандартного набора белков известной молекулярной массы. Калибровочный график строили

с использованием метода линейной регрессии, реализованного в пакете программ SigmaPlot.

2.6. Поиск мотивов в аминокислотных последовательностях.

Поиск зеркально-симметричных мотивов в последовательностях фибриллогенных пептидов. Поиск симметричных участков в последовательности амилоидогенных пептидов осуществляли с помощью программы CLUSTAL X (1.83) (Thompson et al., 1997). Проводили поиск гомологии между аминокислотными последовательностями пептидов, записанными в направлении N-конец – С-конец и в обратном направлении.

Поиск зеркально-симметричных мотивов в протяженных аминокислотных последовательностях. Для поиска симметричных участков в протяженных последовательностях использовали оригинальную программу, написанную на языке С. Программа разработана совместно со студентом Кафедры биофизики СПбГПУ Ю. П. Гармаем (Гармай, Егоров, 2005). С помощью этой программы осуществлялся поиск соответствия между всеми возможными участками в последовательности, записанной в направлении N-конец – С-конец и участками той же последовательности, записанными в обратном направлении.

Для сопоставления аминокислотных последовательностей использовали разбиение аминокислот на группы. Для поиска симметрии все аминокислотные остатки разбивали на 4 группы - заряженные положительно (H, R, K), заряженные отрицательно (E, D), полярные (Q, N, T, S, Y, C, G, P, V), гидрофобные (Y, A, L, W, G, I, V). Считали, что последовательность симметрична в случае, когда позиции аминокислотных остатков из одной группы в последовательности, записанной в направлении C-N, совпадали с позициями аминокислотных остатков той же группы в последовательности, записанной в противоположном направлении. Отбор наиболее симметричных участков производили по максимуму отношения: «количество симметричных остатков в участке»/«длина участка».

2.7. Моделирование пространственной структуры пептидов *in silico*.

Моделирование пространственной структуры пептидов осуществляли с помощью оригинальной программы, написанной на языке С с использованием программных пакетов GROMACS (GROMACS) и SMMP (SMMP). Программа разработана совместно со студентом Кафедры биофизики СПбГПУ Гармаем Ю.П. (Егоров и др., 2006(б)). В основу программы положена концепция оптимизации по энергии с использованием генетических алгоритмов (ГА) (Damsbo et al., 2004). В основе метода ГА лежит несколько основных принципов. В качестве нулевого приближения используются нескольких значительно отличающихся конформаций («популяции конформаций» в терминах ГА). Конформации молекул следующей популяции формируются на основе минимизированных по энергии конформаций предыдущей популяции («наследственность»). Вероятность перехода конформации из популяции в популяцию зависит от ее энергии: чем ниже энергия конформации, тем выше вероятность перехода («отбор»). Сформированная популяция подвергается изменениям («изменчивость»). Полученная популяция снова подвергается оптимизации по энергии, и цикл повторяется. Остановка процесса происходит при уменьшении разброса энергии по популяции до определенного, наперед заданного уровня.

В созданной нами на основе методов молекулярной механики (ММ) и метода ГА программе популяция нулевого приближения генерируется по последовательности аминокислот с помощью случайного задания углов ϕ и ψ при соединении аминокислотных остатков с известной пространственной структурой (база данных программы TINKER (TINKER)). Далее проводится оптимизация пространственной структуры всех представителей популяции; структура оптимизируется без учета влияния растворителя. Оптимизация проводится с помощью программы GROMACS с набором параметров OPLS-AA. Анализируются энергии полученных таким образом конформаций молекул. Кроме того, с помощью программы SMMP вычисляется энергия гидратации. При отборе молекулы для формирования следующей популяции

учитывается сумма энергии взаимодействия между атомами молекулы и энергии гидратации. Вероятность попадания молекулы в следующую популяцию зависит от ее энергии по закону:

$$p_i = \frac{e^{-\frac{E_i}{kT}}}{\sum_j e^{-\frac{E_j}{kT}}},$$

где E_i – значение энергии i -той конформации, рассчитанной методом ММ, а kT либо является задаваемым параметром, либо рассчитывается для каждой генерации по формуле:

$$kT = kT_{coef} \cdot (E_{\max} - E_{\min}),$$

где kT_{coef} , - задаваемая величина, $E_{\max}$ и $E_{\min}$ – максимальное и минимальное значения энергии среди членов генерации.

Такой расчет позволяет адаптивно менять жесткость отбора.

Таким образом формируется следующая популяция, размер которой совпадает с размером популяции нулевого приближения. Затем в значения величин углов ϕ и ψ молекул популяции вносятся изменения. Вероятность изменения угла зависит от абсолютной величины этого изменения по экспоненциальному закону:

$$f(|\theta|) = \lambda e^{-\lambda|\theta|},$$

где λ – задаваемый параметр.

С помощью параметра λ можно регулировать степень случайного возмущения: наиболее вероятными являются малые изменения углов, причем математическое ожидание величины возмущения составляет $1/\lambda$.

В программе также реализован процесс так называемой «рекомбинации», в результате которого случайно выбираются два представителя популяции и первые k аминокислотных остатков, располагающихся с N-конца первого представителя, присоединятся к $(n-k)$ аминокислотных остатков с C-конца второго представителя, и наоборот (n – размер полипептида в а.о.). Частота «рекомбинации» является также задаваемым параметром. Сформированная таким образом популяция снова подвергается оптимизации по энергии и т.д.

Остановка процесса происходит, когда в нескольких циклах подряд разброс энергии между минимальным и максимальным значением энергии конформаций в популяции становится меньше некоторого наперед заданного числа. Программа написана на языке С и выполняется под операционной системой LINUX. Все использованные программы являются бесплатными для академических пользователей и находятся в свободном доступе в сети Интернет.

2.8. Докинг пептида ID.

Мы проводили компьютерное моделирование образования олигомерных комплексов пептида GYDTQTVVNNNGHTDYG (ID) с помощью программы Hex 4.5 (Ritchie, Kemp, 2000; HEX), осуществляющей докинг. Исходными данными для процедуры докинга являются трехмерные структуры белка-«рецептора» и белка-«лиганда». Программа Hex 4.5 позволяет проводить докинг белков, диаметр которых не превышает 40 ангстрем. Первый этап докинга – это вращение и повороты «рецептора» вокруг «лиганда» и поиск возможных взаимных ориентаций этих двух белков. Затем из полученных на этой стадии возможных конфигураций выбираются наиболее энергетически выгодные. В программе Hex 4.5 для этой цели используются методы молекулярной механики, набор параметров CHARMM 27. Мы проводили расчеты с учетом электростатических взаимодействий между атомами. Такой расчет моделирует поведение системы при низкой ионной силе раствора, в котором происходит взаимодействие между молекулами пептида (Ritchie, Kemp, 2000). Докинг осуществляли по следующей схеме: моделировали взаимодействие двух объектов (моно- или олигомеров пептида), затем полученную структуру оптимизировали по энергии с использованием коммерческого пакета программ Hyper Chem 7.01. Оптимизированную структуру использовали на следующем шаге моделирования. При осуществлении докинга мы обнаружили, что олигомеры, образованные одним и тем же количеством мономеров пептида, могли значительно различаться по

структуре и по энергии. Так, например, тетрамер пептида, образованный путем последовательного добавления мономеров, значительно отличался от тетрамера, образованного путем объединения двух димеров. Для отбора олигомеров, потенциально способных участвовать во взаимодействии, мы применяли следующий критерий: олигомер использовался в дальнейших вычислениях только в том случае, когда суммарная энергия составляющих его частей была выше, чем энергия оптимизированного образовавшегося олигомера. Таким образом, мы избегали появления энергетически невыгодных структур и выбирали только пути олигомеризации, проходящие через энергетически выгодные стадии.

2.9. Приготовление препаратов фибрилл пептидов.

5 мг пептида (GYDTQAIVENNESTEYG или GYDTQTVVNNNGHTDYG) растворяли в 1 мл дистиллированной воды в пробирке типа «Эппендорф» объемом 1.5 мл и инкубировали 24 часа при температуре 55°C при постоянном перемешивании.

2.10. Приготовление проб для измерения флуоресценции комплексов образцов с тиофлавином Т.

Измерение флуоресценции комплексов тиофлавина Т с фибриллами проводили по модифицированному методу (Le Vine, 1993): 20 мкл раствора фибрилл концентрацией 3 мкМ добавляли к 1980 мкл буфера до конечных концентраций: 250мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8.0, 6 мкМ Тиофлавин Т. Пробу тщательно перемешивали, затем инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре и переносили в кварцевую кювету. Регистрацию спектров флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра AVANTES AvaSpec-2048 (Источник света AvaLight-XE, фильтр ФС 1-4). Применение фильтра было необходимо для исключения сигнала, поступающего на регистрирующее устройство спектрофлуориметра вследствие рассеяния излучения. Пропускание данного фильтра в спектральном диапазоне

460-600 нм (вблизи максимума флуоресценции тиофлавина – 482 нм) равно нулю, в то время как пропускание вблизи максимума возбуждения данного красителя (440 нм) составляет около 60%. В качестве нулевой пробы использовали белок в растворимой форме в той же концентрации.

2.11. Электронная микроскопия фибрилл.

Электронную микроскопию проводили на базе ГУ НИИ Гриппа РАМН под руководством к.б.н. Сироткина А.К. и на базе Ботанического Института РАН. Подготовку препаратов для электронной микроскопии осуществляли по стандартной методике негативного контрастирования. Каплю (20 мкл) исследуемого образца (концентрация 0.25 мМ) наносили на пленку *Parafilm*. На каплю помещали 200-ячеечную медную подложку с углеродным покрытием, после 15 с сорбции подложку два раза по 15 с отмывали дистиллированной водой и контрастировали 1.5% раствором натриевой соли фосфорновольфрамовой кислоты (рН 7.4) в течение 15 с. Образец высушивали при комнатной температуре, затем производили исследование на электронном микроскопе JEOL JEM 100S или TESLA BS100 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.12. Измерение ферментативной активности лизоцима.

Активность лизоцима определяли в Отделе общей патологии ГУ НИИЭМ РАМН под руководством к.б.н. М. Н. Берлова по методу (Parry et al., 1965). В качестве субстрата использовали препараты клеточной стенки *M. luteus*. Для проведения реакции готовили 0.05% взвесь субстрата в 0.06 М натрий-фосфатном буфере, рН 6.1, содержащем 0.075 М NaCl; взвесь сразу же помещали в ледяную баню. Исследуемую пробу разводили в 0.06 М натрий-фосфатном буфере, рН 6.1, затем добавляли взвесь субстрата в соотношении 1:2, перемешивали и измеряли A_{540} . Реакционную смесь инкубировали в течение 20 минут при 37°C, перемешивая и производя измерения A_{540} каждые 5 минут на спектрофотометре BECKMAN DU 50. В качестве контроля на

спонтанный лизис служила проба, не содержащая фермента. В предварительных экспериментах нами была найдена оптимальная концентрация (0.1 мкг/мл) исследуемого препарата лизоцима куриного яйца

2.13. Получение фибрилл лизоцима и альфа-лактальбумина.

Фибриллы лизоцима получали следующим образом: 10-28 мг лизоцима растворяли в 0.5 мл дистиллированной воды, добавляли 2М раствор NaCl и 1 М Gly-HCl буфер pH 2.0 до концентраций 0.1 М и 0.5 М соответственно. Конечная концентрация лизоцима составляла 5-14 мг/мл. Пробу инкубировали при 55⁰С при постоянном перемешивании в течение 5 суток.

Фибриллы АЛ получали по следующему методу (Goers et al., 2002): раствор АЛ сгущали с помощью лиофильного высушивания до концентрации 14 мг/мл, добавляли 2М раствор NaCl, 1 М Gly-HCl и 100мМ ЭДТА буфер pH 2.0 до концентраций 0.1 М ,0.5 М и 10 мМ соответственно. Конечная концентрация лактальбумина составляла 7 мг/мл. Пробу инкубировали при температуре 55⁰С при постоянном перемешивании в течение 5 суток.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Зеркально-симметричные мотивы в последовательностях фибриллогенных пептидов.

Одной из задач нашего исследования являлось определение амилоидогенных детерминант альфа-лактальбумина человека и лизоцима куриного яйца. Как уже говорилось в разделе 1.8.3, информация о расположении таких участков в последовательности белков может послужить основой для создания пептидных ингибиторов образования токсичных префибриллярных форм и фибриллогенеза этих белков. Мы провели поиск особенностей первичной структуры ряда известных фибриллогенных пептидов с целью выявления сходных особенностей в последовательностях АЛ и лизоцима.

Зеркально-симметричный мотив в последовательности TTR.

В экспериментах по изучению фибриллогенеза TTR, выполненных ранее в нашей лаборатории (Соловьев и др., 2006) было показано, что ограниченный протеолиз, ведущий к утрате С-концевого фрагмента 111-127 приводит к потере данным белком способности к фибриллогенезу. Гидролиз пептидной связи после 110 а.о. приводит к утрате целостности участка TTR 105-115. Искусственный пептид, соответствующий этому участку, способен к фибриллогенезу *in vitro* (Jaroniec et al., 2002) Последовательность пептида 105-115 TTR приведена на рисунке 3.1А. Положение сайта, по которому происходит отщепление, показано звездочкой. Место расщепления пептидной связи располагается близко к центру фибриллогенного пептида, поэтому мы сделали предположение о том, что для фибриллогенеза важно наличие его С-концевого (111-115) участка. Обнаруженной нами особенностью первичной структуры пептида 105-115 TTR является то, что участок 105-114 является мотивом зеркальной симметрии (рисунок 3.1В). Зеркально-симметричный мотив (ЗСМ) представляет собой фрагмент аминокислотной последовательности, содержащий центр симметрии, на равном расстоянии от которого по направлению к N- и С- концу находятся идентичные или близкие по структуре аминокислоты. Роль зеркально-симметричных участков во

взаимодействии белков была впервые показана в работе Шпакова (Шпаков, 1998).

А

105_YTIAAL*LSPYS_115

В

TTR_105-115_N-C

105_YTIAA+LLSPYS_115

TTR_105-115_C-N

115_SYPSLL+AAITY_105

☆ ☆ ☆ ☆ ☆

Рисунок 3.1. А. Положение сайта гидролиза в последовательности фибриллогенного пептида 105-115. В. Мотив зеркальной симметрии в пептиде 105-115 TTR. Зеленым цветом выделены симметричные участки, содержащие гидрофобные остатки в симметричных позициях, желтым - ароматические остатки. Бирюзовым цветом отмечены симметричные остатки - (*) - совпадающие, (:) - одинаковые по заряду/гидрофобности, (.) - совпадающие по полярности. Знаком + обозначен центр симметрии. Далее, если это не оговорено особо, цветовые обозначения сохраняются и для поиска гомологии используется программа CLUSTAL X (1.83).

Гидролиз пептидной связи после 111 а.о. приводит к утрате симметрии в этом фрагменте. Мы сделали предположение, что именно нарушение симметрии во фрагменте 105-115 является критичным для фибриллогенеза TTR (Egorov, Solovuyov, 2005). На рисунке 3.2 показано расположение фибриллогенного пептида 105-115 в пространственной структуре мономера TTR.

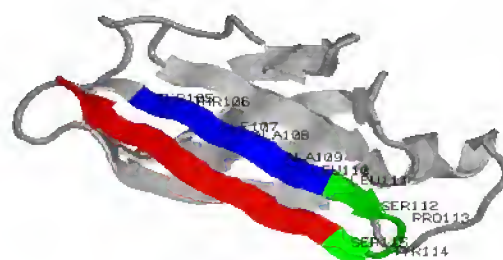


Рисунок 3.2. Мономер TTR. Пептид 105-115 выделен синим и зеленым цветом. Красным цветом обозначен участок 116 - 127. Здесь и далее, если это не оговорено особо, структуры получены из базы данных SWISSPROT, визуализация с помощью программы RasMol.

Зеркально-симметричный мотив в последовательности фибрилlogenного пептида из лизоцима фага T4. Наличие мотивов зеркальной симметрии обнаружено нами также и в некоторых других естественных и синтезированных фибрилlogenных пептидах. Так, мотивы зеркальной симметрии присутствуют в последовательности фибрилlogenного пептида (11-36) из лизоцима фага T4 (Liu et al., 2004). На рисунке 3.3 представлен мотив зеркальной симметрии (11-31), присутствующий в этом пептиде.

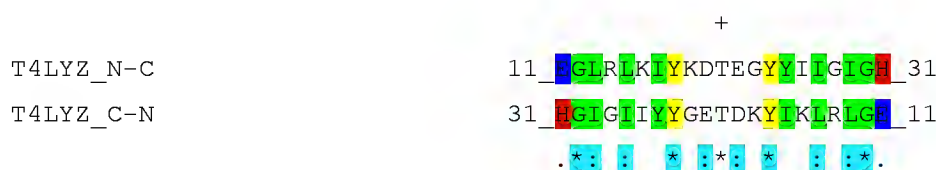


Рисунок 3.3. Расположение мотива зеркальной симметрии в последовательности фибрилlogenного пептида из лизоцима фага T4. Здесь и далее красным и синим цветом обозначены противоположно заряженные остатки симметричных позиций.

Пептид KFFEAAKKFFE. π - π -стэкинг и ионные взаимодействия.

На рисунке 3.4 представлена последовательность не природного фибрилlogenного пептида KFFEAAKKFFE, описанного в работе (Makin et al., 2005). Мы обнаружили, что он также содержит зеркально-симметричный мотив.



Рисунок 3.4. Мотив зеркальной симметрии в последовательности фибрилlogenного пептида, описанного в работе (Makin et al., 2005).

При анализе рассеяния рентгеновских лучей на фибриллах этого пептида было показано, что основными взаимодействиями, стабилизирующими структуру фибриллы, являются водородные связи между антипараллельными

бета-тяжами, ориентированными перпендикулярно оси фибриллы. Отдельные пачки бета-тяжей взаимодействуют между собой за счет π - π взаимодействий между фенилаланинами на концах пептида. Авторы предполагают, что именно такие взаимодействия между боковыми цепями ароматических аминокислотных остатков важны для формирования перекрещенных бета-структур фибрилл. Роль взаимодействий между ароматическими остатками в стабилизации структуры фибриллы отмечается также в работе (Azriel, Gazit, 2002). Также было показано, что в составе фибриллы взаимодействуют боковые цепи заряженных остатков К и Е. Предполагается, что такие взаимодействия приводят к сближению азотов и кислорода пептидных связей мономеров и таким образом способствуют образованию водородных связей между отдельными бета-тяжами (Makin et al., 2005). Сходный механизм реализуется и при фибриллогенезе полипептидов, состоящих из чередующихся гидрофобных и заряженных остатков, расположенных симметрично относительно некоторого центрального аминокислотного остатка (Ryadnov et al., 2003; Zhang et al., 1993; Luhers et al., 2005).

Гидрофобные аминокислотные остатки в последовательностях зеркально-симметричных мотивов. В работе (Sedman et al., 2005) описан минимальный фибриллогенный фрагмент амилина (SNNFGAILSS). Мы обнаружили, что он также содержит зеркально-симметричный мотив, однако не содержит заряженных остатков (рисунок 3.5). По-видимому, в фибриллогенезе такого пептида играет роль взаимодействие между гидрофобными остатками. Роль периодического расположения гидрофобных остатков и симметрии их расположения в фибриллогенезе фрагментов бета-амилоидного пептида обсуждается в работах (Tjernberg et al., 2002; Wang, Hecht, 2002). В работе (Wang, Hecht, 2002) было показано, что периодическое расположение гидрофобных остатков в последовательности искусственного полипептида со структурой (ГПГПГПГПиии)₆ (Г-гидрофобные остатки, П – полярные, иии – бета-изгиб) необходимо для его фибриллогенеза. Аминокислотная замена,

нарушающая периодичность чередования гидрофобных остатков, приводила к утрате таким пептидом способности к формированию фибрилл.

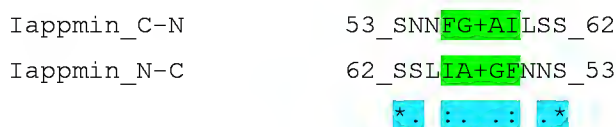


Рисунок 3.5. Зеркально-симметричный мотив в последовательности фибриллогенного пептида из амилина.

Другим примером участия гидрофобных остатков в формировании фибрилл является искусственный амилоидогенный пептид, соответствующий консервативному участку прионных белков млекопитающих AGAAAAGA (Gasset et al., 1992). Такой пептид состоит только из гидрофобных остатков и является полностью зеркально-симметричным (Рисунок 3.6).



Рисунок 3.6. Зеркально-симметричный фибриллогенный пептид, соответствующий консервативному участку прионов млекопитающих.

Позднее было показано (Norstrom, Mastrianni, 2005), что наличие такого симметричного гидрофобного участка в белке является необходимым для индукции фибриллогенеза при заражении хомячка прионным белком.

Полярные аминокислоты в составе зеркально-симметричных мотивов.

С другой стороны, известна пространственная структура гидрофильного фибриллогенного пептида, гомологичного фрагменту прионного белка дрожжей (Рисунок 3.7) (Nelson et al., 2005). В центре такого пептида располагаются полярные аминокислотные остатки. Была показана роль взаимодействия между аминокислотными остатками центрального участка

данного пептида в фибриллогенезе. Взаимодействия между аминокислотными остатками, обуславливающие фибриллогенез этого пептида, схематически представлены на рисунке 3.8. Пептид также содержит мотив зеркальной симметрии.

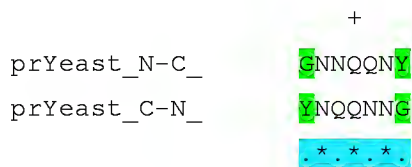


Рисунок 3.7. Симметрия в фибрилlogenном пептиде, гомологичном участку прионного белка дрожжей.

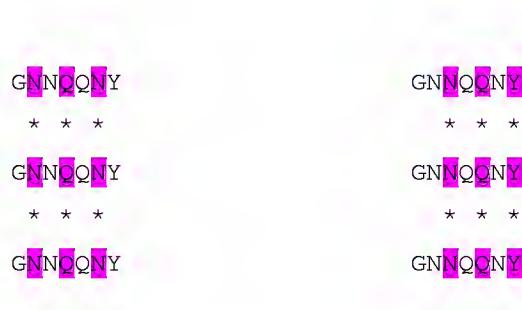


Рисунок 3.8. Схема обуславливающих фибриллогенез взаимодействий между аминокислотными остатками пептида GNNQQNY. Молекулы пептида в составе фибрилл располагаются параллельно – и происходит взаимодействие между боковыми остатками, выделенными на левой части рисунка. Такие стопки параллельно расположенных молекул способны взаимодействовать также (со сдвигом на 1 аминокислотный остаток) между собой. В этом случае сближены боковые цепи остатков, выделенных лиловым цветом на правой части рисунка. Звездочками (*) обозначены связи между боковыми цепями аминокислотных остатков (no Nelson et al., 2005).

Полиаминокислоты. Необходимо отметить, что многие полиаминокислоты также способны образовывать аномальные фибриллы. Так, существуют, по крайней мере, два заболевания, патогенез которых связан с обуславливающими их возникновение аномальным фибриллогенезом гомоаминокислотных участков в последовательностях белков – это болезнь Хантингтона (возникновение полиглутаминового участка) и окулофарингеальная миодистрофия (возникновение полиаланинового участка). Кроме того, способность образовывать фибриллы *in vitro* показана для полилейцина,

полиглутаминовой кислоты и полилизина. Полиглутамновая кислота и полилизин образуют фибриллы при pH, обеспечивающем нейтральность боковой цепи, но при смешивании способны к фибрилlogenезу и при нормальных условиях (Fandrich, Dobson, 2002).

Заключение. Таким образом, по крайней мере, 6 рассмотренных фибрилlogenных пептидов обладают зеркальной симметрией. При этом в приведенных примерах симметрия образуется за счет пар различных по гидрофобности аминокислотных остатков, что свидетельствует о различии природы взаимодействий, обуславливающих начальные этапы фибрилlogenеза.

Приведенные выше данные привели нас к гипотезе о роли зеркально-симметричных мотивов в фибрилlogenезе некоторых белков и пептидов (Егоров, 2005 в). Поэтому для выполнения задачи поиска амилоидогенных детерминант альфа-лактальбумина и лизоцима мы провели поиск зеркальной симметрии в аминокислотных последовательностях этих белков.

3.2.Предсказание фибрилlogenной детерминанты инсулина.

Мы создали компьютерную программу для поиска мотивов зеркальной симметрии в протяженных аминокислотных последовательностях (См. раздел 2.6) и провели такой поиск в последовательностях белков и пептидов с неизвестными фибрилlogenными детерминантами.

При анализе первичной структуры инсулина нами был обнаружен максимально симметричный пептид (10-16) в цепи В этого белка (Егоров, 2005(б, в, г)). Структура и расположение такого мотива в пространственной структуре инсулина представлена на рисунке 3.9. Видно, что способные к π - π взаимодействию аминокислотные остатки находятся снаружи глобулы.

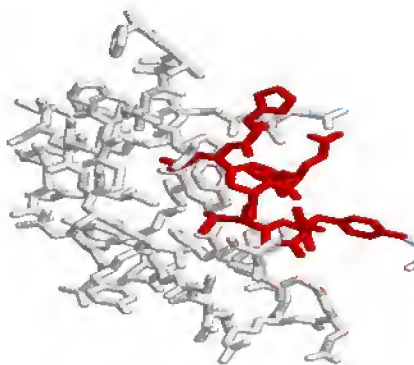
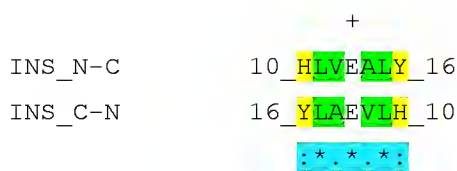


Рисунок 3.9. Структура и расположение зеркально-симметричного мотива (10-16 а.о.) в цепи В инсулина.

Позднее в работе (Gibson, Murphy, 2006) было показано, что данный фрагмент является фибриллогенной детерминантой инсулина. На основании этих данных авторами был создан пептидный ингибитор фибриллогенеза, представляющий собой такой пептид с добавлением 5 аргининовых остатков с N-конца (См. раздел 1.8).

3.3.Определение потенциальных амилоидогенных детерминант в последовательности альфа-лактальбумина.

Мотив зеркальной симметрии в последовательности альфа-лактальбумина.

Мы провели поиск зеркально-симметричных мотивов в последовательностях альфа-лактальбумина человека. На рисунке 3.10 приведен наиболее симметричный участок в последовательности альфа-лактальбумина.

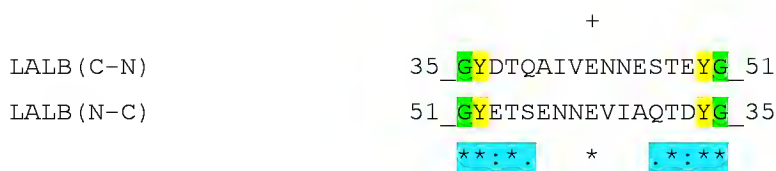


Рисунок 3.10. Наиболее симметричный участок в последовательности альфа-лактальбумина человека.

На рисунке 3.11 показано расположение такого участка в пространственной структуре этого белка. Видно, что участок 35-51 а.о. находится на поверхности глобулы АЛ, что свидетельствует о наличии потенциальной возможности участия такого пептида во взаимодействиях, обуславливающих фибриллогенез, даже при неполной денатурации ЛА.



Рисунок 3.11. Расположение симметричного участка в пространственной структуре альфа-лактальбумина (выделено красным цветом).

Для изучения фибрилlogenных свойств участка 35-51 ЛА человека такой пептид был синтезирован, и были изучены его фибрилlogenные свойства.

Фибриллогенез пептида 35-51 ЛА. При электронной микроскопии пептида, идентичного участку 35-51 (GYDTQAIVENNESTEY**G**, далее – пептид WT) ЛА человека, инкубировавшегося в условиях для фибриллогенеза в условиях ЛА наблюдали сорбировавшиеся на подложке филаменты толщиной около 10 нм (рисунок 3.12).



Рисунок 3.12. Результаты электронной микроскопии фибрилл пептида WT. Прямоугольник в левом углу соответствует 1 мкм. Наблюдаются как отдельные фибриллы, так и пучки фибрилл.

Опыты по измерению флюоресценции ThT показали, что такие фибриллы способны увеличивать квантовый выход флуоресценции этого красителя, что является свойством, характерным именно для аномальных фибрилл. Далее была проведена сканирующая зондовая микроскопия образцов, сорбировавшихся на поверхности слюды, покрытой слоем углерода (рисунок 3.13). Углеродное покрытие было необходимо для изменения сорбционных свойств поверхности, так как в предварительных опытах было показано, что поверхность только что отщепленной от блока слюды сорбирует преимущественно крупные агрегаты, что делает невозможным наблюдение протофиламентов и отдельных фибрилл.

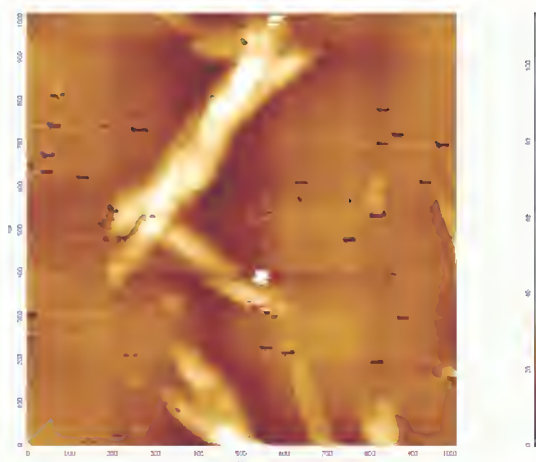


Рисунок 3.13. Результаты АСМ фибрилл пептида WT, сорбировавшихся на поверхности слюды, покрытой углеродной пленкой. Поле 1*1 мкм. Толщина протофиламентов около 10 нм. Наблюдаются пучки протофиламентов.

Индукция фибриллогенеза. Добавление фибрилл пептида WT к раствору АЛ человека в условиях для фибриллогенеза приводило к появлению фибрилл АЛ через сутки после начала инкубации. В то же время для образования фибрилл АЛ в отсутствие пептида обычно требовалось более четырех суток. Это свидетельствует о присутствии в последовательности пептида WT фибриллогенной детерминанты АЛ.

Сопоставление с данными литературы. Из литературных данных известно, что утрата фрагмента АЛ 43-60 а.о. при ограниченном протеолизе этого белка, не препятствует его фибриллогенезу (Laureto et al., 2005). Утрачиваемый фрагмент содержит большой участок фрагмента АЛ, гомологичного пептиду WT (43-51 а.о.). На рисунке 3.14 представлено расположение симметричного участка в последовательности бета-домена альфа-лактальбумина.

29_TMFHTS **GYDTQAIVENNESTEYGL**LFQISNKLW_60
 29_TMFHTSGYDTQ**AIVENNESTEYGLFQIS**NKLW_60

Рисунок 3.14. Бета-домен альфа-лактальбумина человека. Красным цветом обозначен симметричный участок, синим - участок, выщепление которого не препятствует фибриллогенезу лактальбумина.

Сопоставление этих фактов позволило сделать предположение о наличии в последовательности АЛ человека более, чем одной фибриллогенной детерминанты.

3.4. Создание пептида на основе первичной структуры симметричного участка бета-домена альфа-лактальбумина.

Для изучения роли симметричных фрагментов в фибриллогенезе пептида WT и АЛ был синтезирован пептид, GYDTQTVVNNNGHTDYG, обладающий зеркальной симметрией и гомологичный пептиду WT (рисунок 3.15).

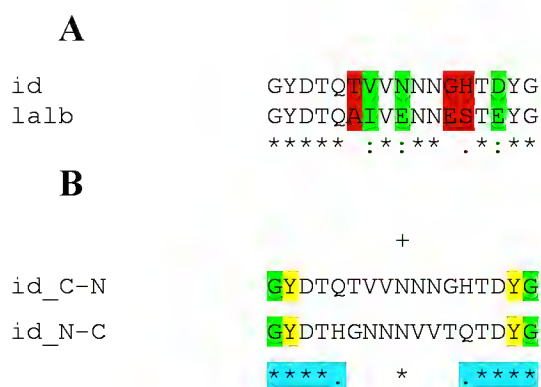


Рисунок 3.15. (А) Выравнивание последовательностей участка 35-51 ЛА и пептида. Красным цветом отмечены замененные отличающиеся по полярности аминокислоты, зеленым – замененные на сходные по полярности. (В) Зеркально-симметричный мотив в пептиде ID.

Последовательность пептида GYDTQTVVNNNGHTDYG (далее – пептид ID) отличается шестью аминокислотными остатками от соответствующего участка последовательности альфа-лактальбумина человека, причем замены а.о. с существенно отличающимися свойствами проведены в центральной его части. Пептид ID сохраняет N- и C-концевые симметричные участки лактальбумина человека, но при этом содержит замену серина 13 на положительно заряженный гистидин, гидрофобного аланина 6 на полярный треонин и полярной глутаминовой кислоты 12 на гидрофобный глицин, что, в случае принадлежности центрального фрагмента к последовательности амилоидогенного детерминанта должно привести к неспособности такого пептида к фибриллогенезу.

В качестве первого этапа проверки наличия потенциальной способности такого пептида к фибриллогенезу мы провели компьютерное моделирование его пространственной структуры.

Моделирование пространственной структуры пептида ID in silico. В настоящее время не существует какого-либо универсального подхода для компьютерного моделирования пространственной структуры пептидов и белков. Результаты, получающиеся с использованием различных программ,

осуществляющих оптимизацию структуры полипептида по энергии, обычно значительно отличаются.

Для моделирования пространственной структуры *in silico* мы использовали оригинальную программу, использующую методы молекулярной механики и концепцию генетических алгоритмов (Егоров и др., 2006(б)). Такой выбор был обусловлен несколькими причинами:

1. Использование метода генетических алгоритмов позволяет решить проблему «нулевого приближения», то есть при использовании нашей программы конформация, получающаяся после оптимизации, не зависит от конформации, заданной в качестве начальной.

2. Созданная нами программа позволяла оптимизировать пространственную структуру пептида с учетом энергии гидратации.

3. Сравнение значения энергий, вычисленных для структур, оптимизированных с помощью нашей программы и с помощью нескольких коммерческих пакетов программ показало, что полученная с помощью нашей программы структура имеет минимальную энергию.

В результате моделирования мы получили структуру пептида, обладающую минимальной энергией и минимальной гидрофобной поверхностью. Изображение такой структуры представлено на рисунке 3.16.

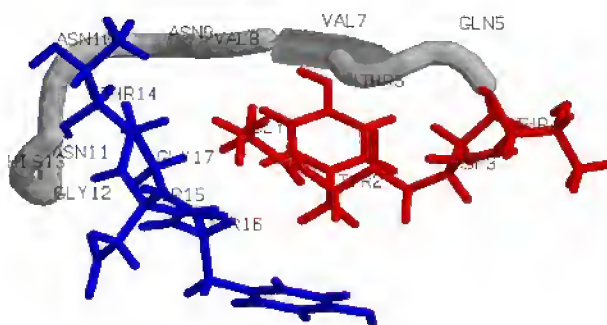


Рисунок 3.16. Структура мономера пептида, полученная в результате оптимизации по энергии. Остатки 1-4 обозначены красным цветом, остатки 14-17 обозначены синим цветом.

Моделирование образования фибрилл пептида ID *in silico*. При взаимодействии белков существует большое число факторов, влияющих на этот процесс, причем некоторые факторы, остающиеся за рамками используемой модели, могут играть определяющую роль. Поэтому важно отметить, что, несмотря на достоинства методов моделирования взаимодействий *in silico*, данные, полученные при проведении таких экспериментов, всегда следует использовать только в качестве исходных предположений при планировании экспериментов *in vitro* (Villoutreix, 2001).

Некоторые конформации пептида ID, полученные в процессе моделирования, *in silico* были способны к образованию фибриллоподобных агрегатов. При этом энергетически выгодным являлось взаимодействие между димерами пептидов (рисунок 3.17), приводящее к образованию тетрамеров. (рисунок 3.18). При дальнейшей олигомеризации элементарными структурами, участвующими в формировании фибриллы, являлись окта- и 16-меры пептида. (Егоров и др., 2006(б)).

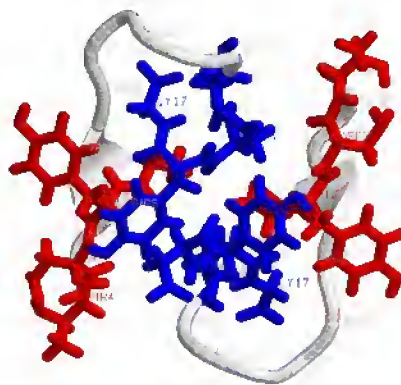


Рисунок 3.17. Компьютерное моделирование образования димера пептида. Остатки 1-4 обозначены красным цветом, остатки 14-17 обозначены синим цветом. Взаимодействуют участки 14-17 первой и второй молекулы.

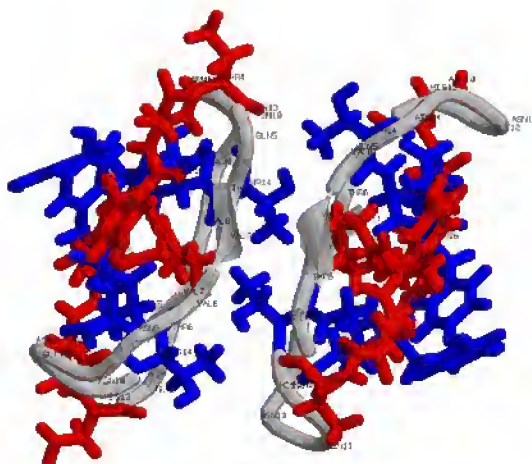


Рисунок 3.18. Компьютерное моделирование образования тетрамера пептида. Взаимодействуют остатки 1-4 и 14-17 разных димеров.

Следующими энергетически выгодными шагами олигомеризации являлось образование 8-, 16-меров пептида (рисунок 3.19А). На стадии 16-мера большая часть гидрофобных остатков оказывалась внутри глобулы. 16 –меры были способны к взаимодействию между собой за счет гидрофобных контактов между остатками V7 и V8, боковые цепи которых оказываются снаружи 16-мера (рисунок 3.19В). Таким образом 16-меры способны объединяться с образованием линейной структуры толщиной около 7 нм.

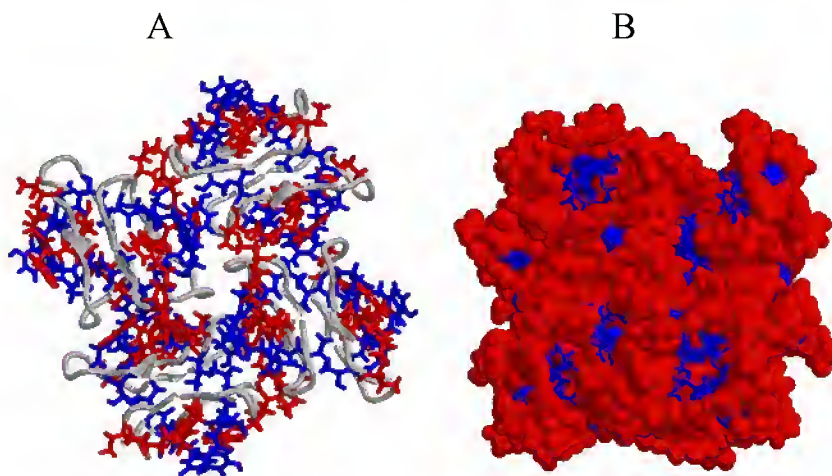


Рисунок 3.19. А. Компьютерное моделирование образования 16-мера пептида. Остатки 1-4 и 14-17 обозначены красным и синим цветом соответственно. В. Гидрофобные остатки на поверхности 16-мера. Гидрофильные остатки выделены красным, гидрофобные – синим цветом.

Сравнение энергий взаимодействия олигомеров, полученных в результате докинга, показало, что наиболее стабильными являются тетра- и октамеры пептида. Таким образом, в результате компьютерного моделирования фибриллогенеза пептида ID мы получили следующие результаты:

1. Пептид способен образовывать фибриллярные структуры толщиной около 7 нм
2. Взаимодействия между С-концевыми участками молекул пептида являются критичными для образования димеров
3. Взаимодействия между симметричными N- и С- концевыми участками молекул пептида являются критичными для образования тетрамеров
4. Наиболее стабильными олигомерами являются тетрамеры пептида.
5. Наиболее энергетически выгодной последовательностью событий при фибриллогенезе пептида является последовательное образование ди-, тетра-, окта- и 16 мер. 16- меры пептида способны взаимодействовать, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий.

Фибриллогенез пептида ID .При электронной микроскопии пептида, инкубировавшегося в течение суток в условиях для фибриллогенеза, было выявлено, что на углеродной подложке сорбировались протофиламенты толщиной около 10 нм (рисунок 3.20).

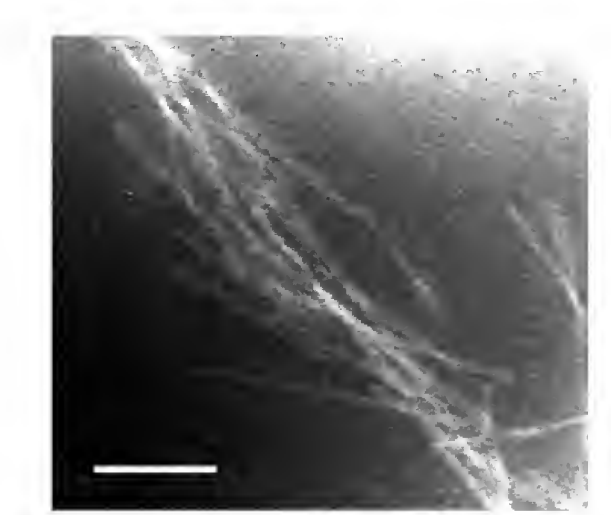


Рисунок 3.20. Результаты электронной микроскопии образцов, содержащих пептид ID. Белый прямоугольник в правом углу соответствует 200 нм.

Также мы провели АСМ образцов, содержащих фибриллы пептида ID. Для увеличения разрешения метода при подготовке проб для АСМ сорбция образцов проводилась не на слюдяной подложке, а на поверхности гидрогеля. В результате этого эксперимента мы выявили, что на поверхности гидрогеля сорбировались сдвоенные протофиламенты пептида толщиной около 10 нм (рисунок 3.21).

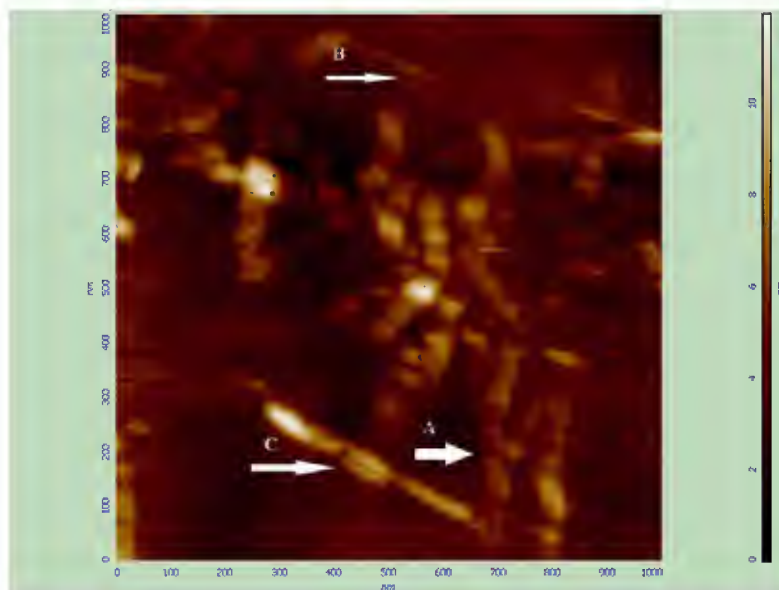
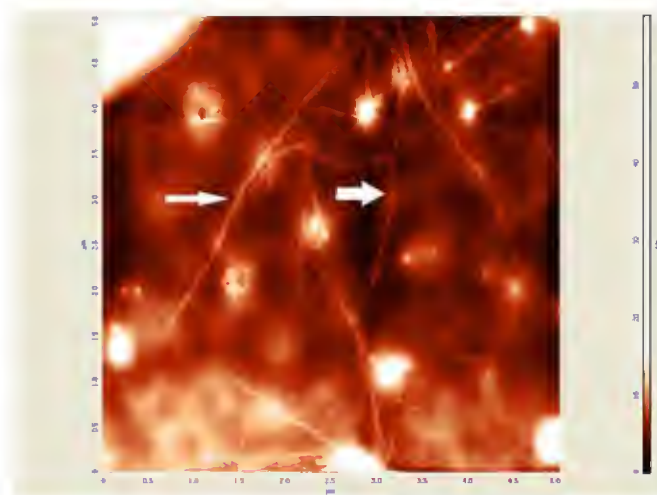


Рисунок 3.21. Атомная силовая микроскопия фибрилл, сорбировавшихся на поверхности гидрогеля. *A, C* – сдвоенные протофиламенты, *B* – одинарный протофиламент. Поле – 1*1 мкм.

Наблюдаемая толщина протофиламентов совпала с толщиной фибриллярных структур, образование которых было предсказано в экспериментах *in silico*.

В дальнейших экспериментах по изучению тонкой структуры фибрилл мы провели предварительную фильтрацию образцов раствора, содержащего фибриллы, через бактериальный фильтр с размерами пор 0.45 мкм и нанесли фильтрованный раствор на поверхность слюды. Результаты атомной силовой микроскопии таких образцов представлены на рисунке 3.22.

А



В

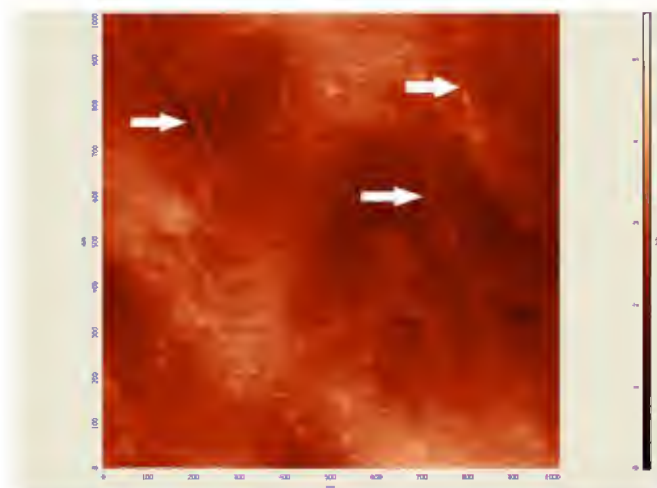


Рисунок 3.22. Атомная силовая микроскопия образцов пептида ID после фильтрации. На панели А – фибриллы толщиной около 30 нм (указано стрелочками). Поле – 5*5 мкм. На панели В – протофибриллы толщиной около 10 нм (увеличенный участок поверхности между фибриллами на панели А, указано стрелочками) Поле – 1*1мкм..

Помимо разветвленных фибрилл толщиной около 30 нм наблюдали также центры роста фибрилл (рисунок 3.23). По-видимому, такие центры, имеющие диаметр порядка 0.2 мкм прошли через бактериальный фильтр вместе с растущими из них фибриллами.

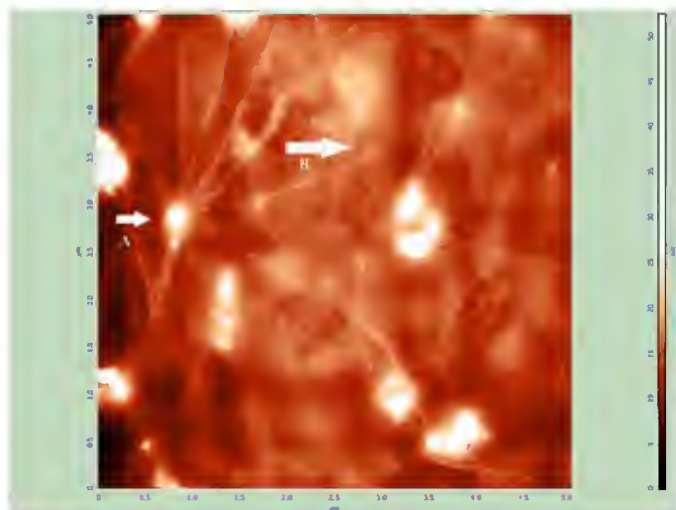


Рисунок 3.23. Центры образования фибрилл (А) и растущие из них фибриллы (В) Поле – 5*5 мкм.

Таким образом, вышеописанные эксперименты позволили сделать вывод относительно последовательности событий, происходящих в процессе образования фибрилл пептида. По-видимому, первоначальным этапом фибриллогенеза является образование протофибрилл толщиной около 10 нм (рис. 3.20, 3.22В). Затем такие протофибриллы образуют сдвоенные структуры (рис. 3.21), способные к дальнейшему присоединению протофибрилл (рис. 3.22А). Начальным этапом роста фибрилл является, по-видимому, образование центров роста фибрилл (рисунок 3.23).

Устойчивые к SDS олигомеры в составе фибрилл пептида ID. Для выявления олигомеров, являющихся элементарными структурными единицами фибрилл, был проведен денатурирующий электрофорез проб, содержащих фибриллы пептида. Наблюдались мажорные зоны, соответствующие по электрофоретической подвижности 7-7.5 кДа (рисунок 3.24). Кроме того, наблюдались минорные зоны, соответствующие большему молекулярному весу. Положение минорных зон варьировало в зависимости от срока фибриллогенеза.

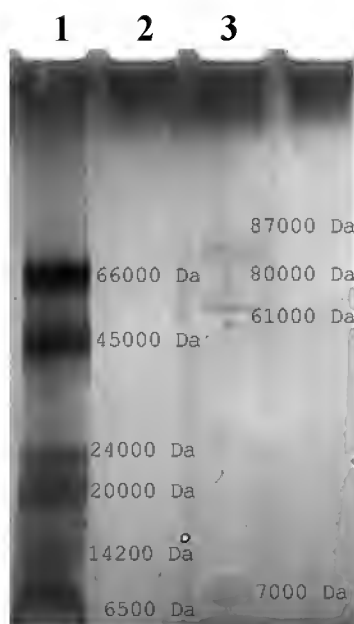


Рисунок 3.24. Электрофоретическое разделение компонентов фибрилл пептида в присутствии SDS. На дорожке 1 – коммерческий маркер SIGMA,.

Молекулярные массы, соответствующие зонам на дорожке 3, вычислены с помощью программы Total Lab120. Они соответствуют тетрамерам, 32, 40- и 47-мерам пептида.

Интересен тот факт, что в случае, когда предварительного кипячения пробы в SDS не производилось, наблюдалось уменьшение интенсивности зоны, соответствующей тетрамерам. Это свидетельствует в пользу того, что SDS способствует диссоциации фибрилл, образованных пептидом, на низкомолекулярные составляющие, способные входить в ПААГ.

При кипячении пробы с формамидом не выявлялись зоны, соответствующие молекулярной массе порядка 7 кДа, но наблюдалось появление зоны, соответствующей молекулярной массе 2 кДа, что соответствует молекулярной массе мономера пептида (данные не показаны).

Сопоставление с данными литературы. Устойчивость компонентов амилоидных фибрилл к кипячению с SDS обсуждается в работе (Ventura, 2005) как свойство, характерное именно для аномальных фибриллярных агрегатов. В работе (Крындушкин и др., 2002) при изучении прионного белка дрожжей было показано, что под воздействием SDS агрегаты, образующихся при фибрилlogenезе прионного белка, распадаются на олигомеры, состоящие в

среднем из 4-20 молекул Sup35. Образование при фибриллогенезе пептида ID устойчивых к SDS агрегатов может свидетельствовать о сходстве механизмов, обуславливающих взаимодействия, ответственные за формирование элементарных составляющих фибрилл.

Наличие устойчивых к SDS тетрамеров свидетельствует о различии энергии взаимодействий, обуславливающих существование тетрамеров и олигомерных форм более высокого порядка. Важно отметить, что в компьютерной модели в формировании тетрамеров пептида определяющим является взаимодействие между N- и C-концевыми зеркально-симметричными участками пептида, что косвенно свидетельствует в пользу роли ЗСМ в начальных этапах фибриллогенеза.

Олигомерные формы пептида ID в растворе. Гель-фильтрация супернатанта, полученного после центрифугирования фибрилл пептида, позволила выявить наличие в пробе фракций с молекулярной массой порядка 7-7.5 и 15 кДа, что соответствует тетрамерам и октамерам пептида.

Сопоставление с данными литературы. Наличие в растворе олигомеров фибриллогенных пептидов было описано ранее для бета-амилоидного пептида (Bitan et al., 2003). Было показано, что наиболее амилоидогенный бета-амилоидный пептид протяженностью 42 а. о. присутствует в растворе только в виде пентамеров и гексамеров, в то время как пептид бета-амилоид протяженностью 40 а. о. присутствует также в виде мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров, находящихся в динамическом равновесии.

Обнаружение тетрамеров и октамеров пептида в водном растворе также согласуется с результатами компьютерного моделирования фибриллогенеза пептида.

Влияние пептида ID на фибриллогенез альфа-лактальбумина. Для проверки соответствия амилоидогенных детерминант альфа-лактальбумина (АЛ) и пептида ID были проведены эксперименты по индукции фибриллогенеза альфа-лактальбумина фибриллами этого пептида.

Изображение фибрилл АЛ (7 мг/мл), полученное с помощью атомной силовой микроскопии, представлено на рисунке 3.25. Фибриллы, образованные АЛ, имели толщину – 6-8 нм и сорбировались на поверхности слюды в составе пучков длиной порядка нескольких мкм, состоящих из нескольких десятков уложенных параллельно фибрилл.

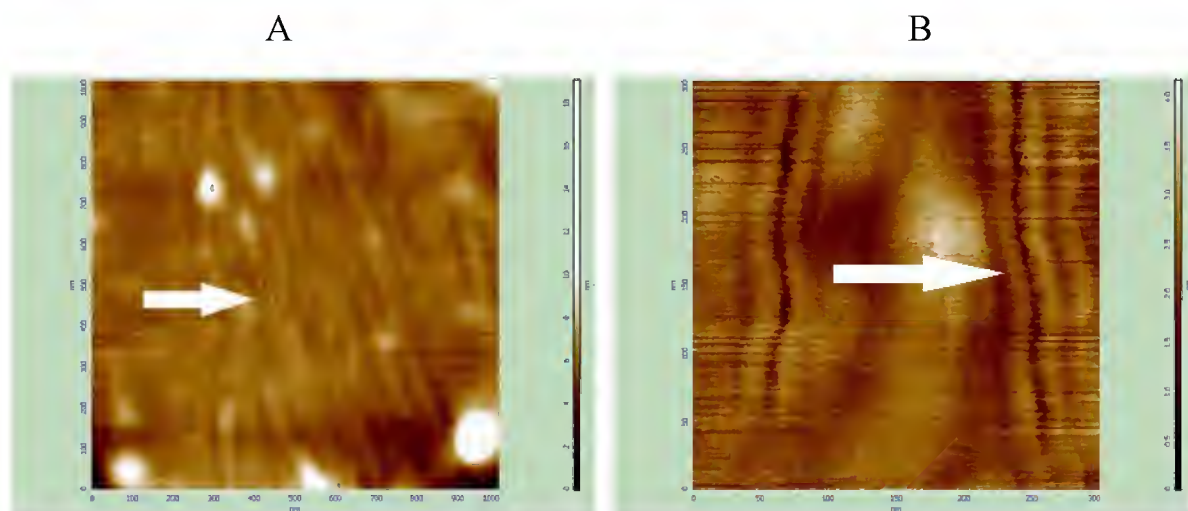


Рисунок 3.25. Результаты АСМ фибрилл альфа-лактальбумина *А – Пучки фибрилл лактальбумина, поле 1*1 мкм В – строение пучка фибрилл. Стрелкой указана отдельная фибрилла поле 300*300 н.м.*

В предварительных экспериментах было показано, что инкубация АЛ в концентрации 7 мг/мл в PBS-буфере при 55°C не приводила ни к фибриллогенезу, ни к агрегации белка (данные не показаны). При добавлении 10 мкл водного раствора пептида ID в концентрации 3 мг/мл к 1 мл такого раствора через два часа инкубации при 55°C наблюдали возникновение опалесценции, что свидетельствовало об агрегации АЛ. Такие агрегаты были способны увеличивать флюоресценцию ThT. Контрольные пробы, содержавшие белок и пептид в соответствующих концентрациях отдельно не вызывали увеличения флюоресценции ThT. Это указывало на способность пептида индуцировать фибриллогенез и, следовательно, на наличие в его структуре фибриллогенных детерминант АЛ. Однако наблюдаемая величина флюоресценции была в 30 раз ниже, чем величина флюоресценции, вызываемой фибриллами, образовавшимися из АЛ в той же концентрации в

условиях для фибриллогенеза. Это отличие могло быть связано как с разницей в количестве фибрилл, так и с разницей в их структуре. Для изучения структуры агрегатов мы провели атомную силовую микроскопию образцов АЛ, подвергнувшегося инкубации при 55°C в присутствии пептида ID (рисунок 3.26). Наблюдали как вытянутые фибриллярные агрегаты (3.26А), так и сеть коротких фибриллярных агрегатов (3.26В), напоминающих центры роста фибрилл (Ср. с 3.23). Инкубация лизоцима с пептидом ID не приводила к агрегации этого белка, что свидетельствует о наличии в последовательности этого пептида фибриллогенных детерминант специфичных именно для АЛ.

А

В

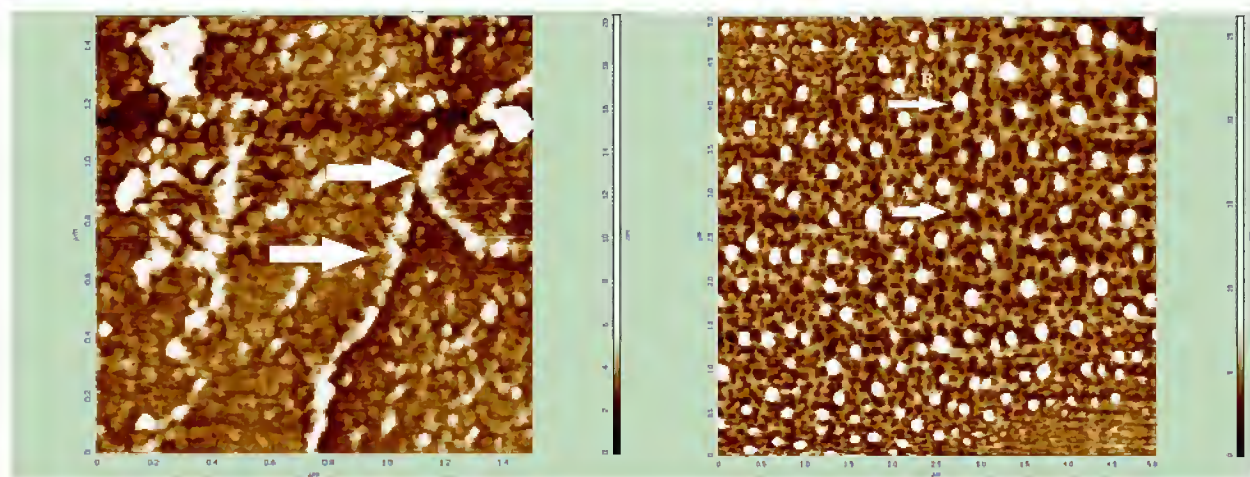
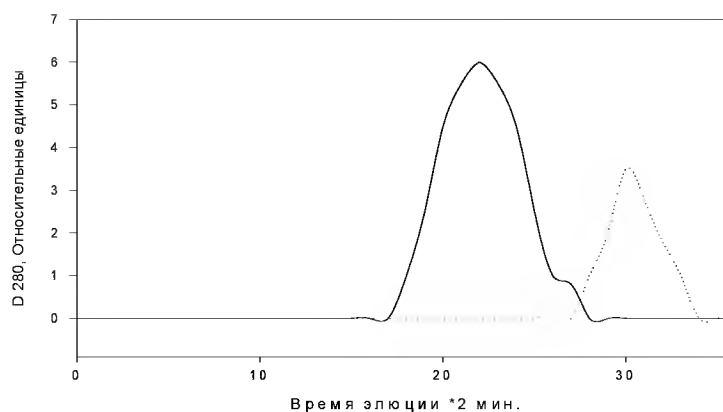


Рисунок 3.26. Разные типы агрегатов, наблюдавшиеся в пробе лактальбумина, подвергнувшегося инкубации при 55°C в присутствии пептида ID. А – фибриллы (указано стрелочками), В- агрегаты (А-сетка, В- центры образования сетки).

Для изучения обуславливающих агрегацию взаимодействий пептида ID и АЛ мы провели гель-фильтрацию супернатанта, полученного после центрифугирования раствора АЛ, подвергнувшегося инкубации при 55°C в присутствии пептида ID в течение суток. Положение пика при гель-фильтрации образца совпадало с положением пика миоглобина лошади (18 кДа), использовавшегося для калибровки колонки. При этом полностью исчезал пик, соответствующий мономеру АЛ (14.2 кДа) (Рисунок 4.33). Молекулярная масса 18 кДа соответствует комплексу молекулы АЛ с двумя молекулами пептида.



По литературным данным (Xu et al., 2005), димер АЛ быка является минимальной префибриллярной формой этого белка, обладающей цитотоксическим действием. Способность двух молекул пептида ID образовывать комплекс с молекулой АЛ позволяет предположить возможность создания ингибитора токсичности префибриллярных форм АЛ на основе пептида ID.

Мотив зеркальной симметрии в последовательности лизоцима. Поиск мотивов зеркальной симметрии в последовательности лизоцима куриного яйца привел нас к обнаружению такого мотива в бета-домене этого белка (рисунок 3.28). Расположение такого участка в пространственной структуре лизоцима представлено на рисунке 3.29.

Рисунок 3.28. Расположение зеркально-симметричного мотива в бета-домене лизоцима. *Жирным шрифтом выделен участок, присутствующий в фибриллогенном пептиде из лизоцима(Krebs et al.,2000) .*



Рисунок 3.29. Расположение зеркально-симметричного мотива в структуре лизоцима (выделение красным цветом).

Косвенным свидетельством в пользу гипотезы о роли симметричного фрагмента лизоцима куриного яйца в фибриллогенезе является тот факт, что аминокислотная замена I55T, приводящая к повышенной фибрилlogenности этого белка, не только изменяет третичную структуру этого белка (Booth et al., 1997), но и повышает степень симметрии зеркально-симметричного мотива (рисунок 3.30).

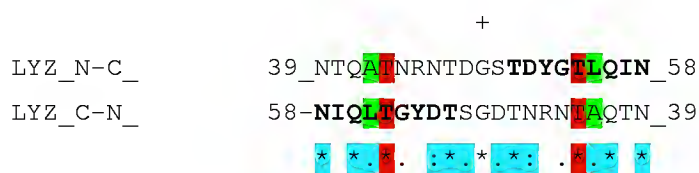


Рисунок 3.30. Зеркально-симметричный мотив в последовательности лизоцима, несущего замену I55T. Положение позиции, в которой появляется дополнительный симметричный остаток, обозначено красным цветом.

Расположение симметричных мотивов в последовательностях альфа-лактальбумина и лизоцима не совпадают (рисунок 3.31). Такое различие может объяснять отсутствие способности фибрилл альфа-лактальбумина вызывать индукцию фибриллогенеза лизоцима (Krebs et al., 2004(б)).

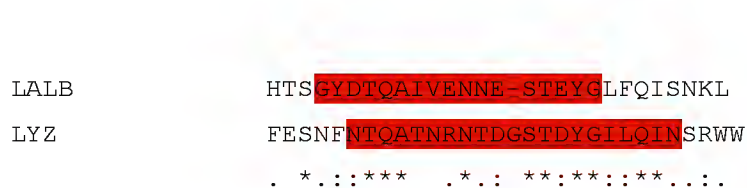


Рисунок 3.31. Расположение симметричных мотивов в последовательностях бета-доменов альфа-лактальбумина и лизоцима.

Гипотеза о роли симметрии в фибрилlogenезе протяженных пептидов. В настоящее время единственным протяженным (более 15 а.о.) пептидом, для которого известна пространственная структура в составе фибрилл, является БАП. В работе (Luhrs et al., 2005) было показано, что при фибрилlogenезе этого пептида определяющим является взаимодействие между аминокислотными остатками 17-42. На рисунке 3.32 представлена реконструкция структуры такого пептида, полученная с помощью анализа малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и обмена дейтерия (Luhrs et al., 2005).

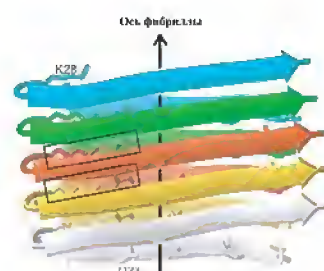


Рисунок 3.32. Структура БАП в составе фибрилл (по данным Luhrs et al., 2005)

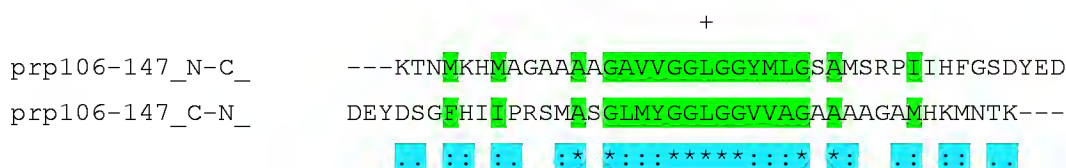
В то же время известны короткие пептиды, гомологичные фрагментам БАП, способные к фибрилlogenезу *in vitro*. На рисунке 3.33 представлены аминокислотные последовательности пептида 17-42, участвующего в формировании фибрилл пептидом 1-42 (Luhrs et al., 2005) и мотив зеркальной симметрии, присутствующий в этом фрагменте. Важно отметить, что пептид 15-23 не участвует в формировании фибрилл БАП 1-42, однако способен к фибрилlogenезу *in vitro* (Lopez de la Paz, Serrano, 2003).



Рисунок 3.33. Мотивы зеркальной симметрии в последовательности БАП.

В последовательности прионного белка человека также располагаются друг за другом два пептида (106-126, 127-147), способные к фибрилlogenезу (Tagliavini et al., 1993), в которых мы обнаружили мотивы зеркальной симметрии (рисунок 3.34). Цельный фибрилlogenный пептид (106-147) также содержит мотив зеркальной симметрии, однако мотивы зеркальной симметрии из составляющих его пептидов (106-126 и 107-147) не вовлекаются в формирование симметрии более высокого порядка.

A



B



C



Рисунок 3.34. Зеркальная симметрия в фибрилlogenном пептиде 106-147(A), 106-126(B) и в пептиде 127-147(C).

Другим примером включения малого симметричного мотива в протяженный является амилин. На рисунке 3.35 приведена структура зеркально-симметричного мотива в составе амилина и расположение минимального фибрилlogenного пептида в этой последовательности (обозначено жирным шрифтом).



Рисунок 3.35. Зеркально-симметричный мотив в последовательности амилина. Комментарии в тексте.

Приведенные примеры позволяют сделать предположение, что в некоторых случаях при фибриллогенезе протяженных пептидов играют роль взаимодействия нескольких амилоидогенных детерминантов. На рисунке 3.36 представлены структуры протяженных фибриллогенных пептидов в составе лизоцима фага Т4 и лизоцима куриного яйца, а также структура симметричного фрагмента 35-51 из лактальбумина. Интересно, что и эти фрагменты в составе белка, и бета-амилоидный пептид в составе фибрилл представляют собой структуру типа шпильки, причем между половинами зеркально-симметричных мотивов располагается бета-изгиб.

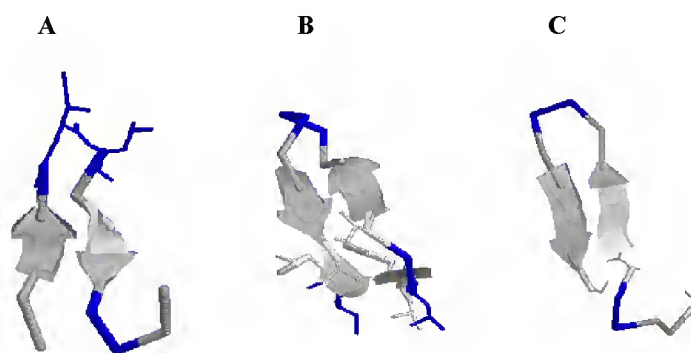


Рисунок 3.36. Структура фибриллогенных пептидов в составе лизоцима куриного яйца (А) и фага Т4 (В) и структура симметричного фрагмента 35-51 в составе альфа-лактальбумина (С). Синим цветом обозначены бета-изгибы.

На рисунке 3.37 представлено выравнивание последовательностей фибриллогенных пептидов из лизоцимов куриного яйца и фага Т4. При отсутствии высокой гомологии имеет место сходство пространственных структур пептидов в составе белков.

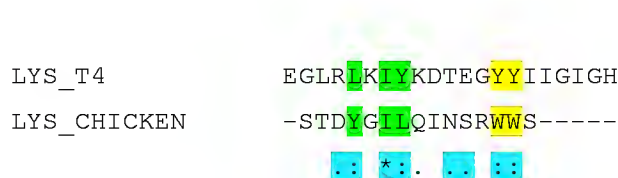
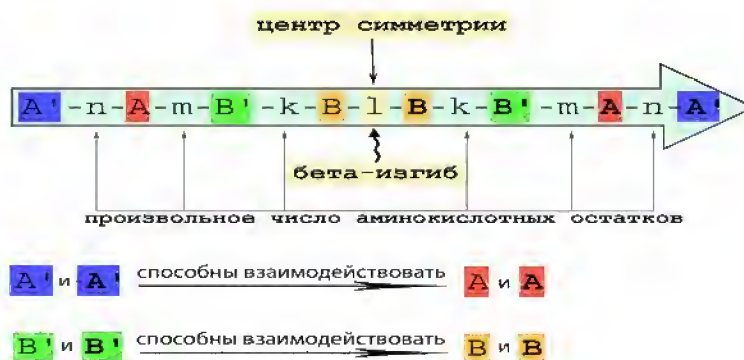


Рисунок 3.37. Выравнивание последовательностей фибриллогенных пептидов из лизоцима фага Т4 и лизоцима куриного яйца.

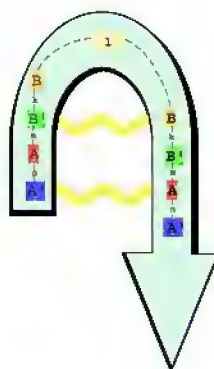
Мы предложили гипотезу (Егоров, 2005 (в), 2006(а)) о роли протяженных зеркально-симметричных мотивов, образующих структуры типа шпильки в фибриллогенезе. На рисунке 3.38 представлена предполагаемая схема такого участия. Данные, полученные Luhrs и соавторами (Luhrs et al., 2005) относительно структуры бета-амилоидного пептида в составе фибрилл, согласуются с этой гипотезой.

1.Общая структура зеркально-симметричных мотивов.



n, m, k, l – число аминокислотных остатков, способное обеспечивать необходимую взаимную ориентацию боковых цепей аминокислотных остатков; в составе участка l – последовательность аминокислотных остатков, склонная к образованию бета-изгиба; A, B – произвольные аминокислотные остатки; A', B' – аминокислотные остатки, боковые цепи которых способны взаимодействовать с боковыми цепями остатков A и B соответственно. Обозначенные жирным шрифтом аминокислотные остатки могут быть идентичными или сходными по свойствам с остатками слева от центра симметрии.

2.Внутримолекулярные взаимодействия, обуславливающие структуру мотива.



(продолжение на следующей странице)

Рисунок 3.38 (продолжение)

3. Возможные межмолекулярные взаимодействия, обусловленные структурой зеркально-симметричного мотива.

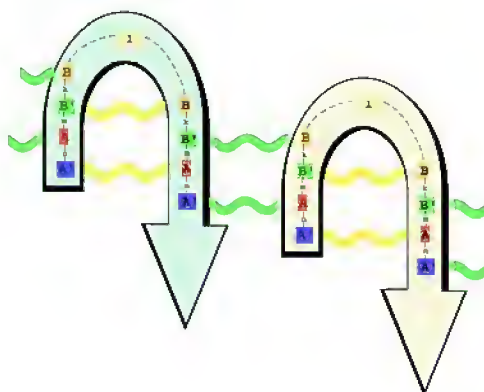


Рисунок 3.38. Схема участия ЗСМ в фибрилlogenезе. Синим и красным цветом обозначены зеркально-симметричные мотивы, принадлежащие разным молекулам. Желтым цветом обозначены внутримолекулярные связи, зеленым — межмолекулярные.

В случае наличия такого механизма образования фибрилл, половины зеркально - симметричных структур также могут быть способными к фибрилlogenезу (рисунок 3.39). Сходный механизм реализуется при фибрилlogenезе короткого пептида из Sup35 (Ср. рисунок 3.39 с рисунком 3.8).

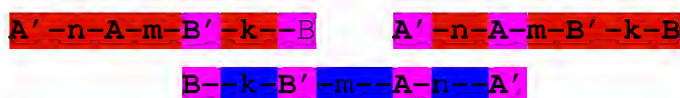


Рисунок 3.39. Возможная схема фибрилlogenеза половины симметричной структуры. Красным и синим цветом обозначены противоположно ориентированные пептиды. Лиловым цветом обозначены взаимодействующие остатки.

На основании гипотезы о роли протяженных зеркально-симметричных мотивов, образующих структуры типа шпильки в фибрилlogenезе мы предложили структуру пептида, потенциально способного влиять на фибрилlogenез лизоцима куриного яйца. Пептид представляет собой половину симметричного мотива и, согласно нашей гипотезе, способен конкурировать с молекулой лизоцима за место присоединения следующего мономера при образовании олигомерных предшественников фибрилл (Рисунок 3.40).

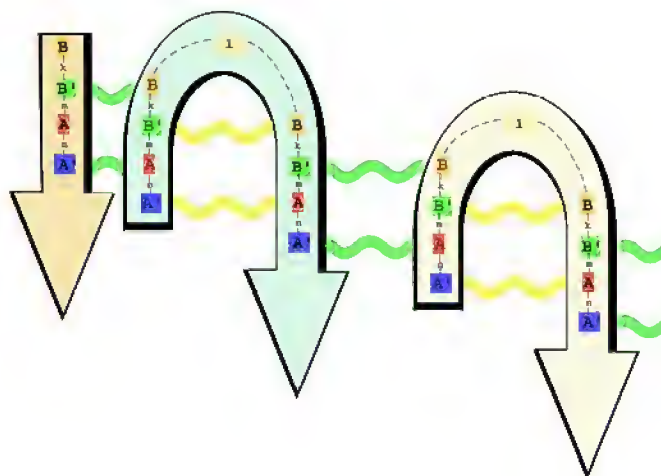


Рисунок 3.40. Присоединение пептида, являющегося половиной симметричной структуры. Пептид обозначен бирюзовым цветом.

В случае участия зеркально-симметричных мотивов в фибрилlogenезе такое взаимодействие может препятствовать образованию обычных префибриллярных форм, обладающих цитотоксическим действием. Нашей задачей являлось исследовать влияние пептида, являющегося половиной зеркально-симметричного мотива, на фибрилlogenез лизоцима.

3.6. Изучение влияния пептида NTQATNRNTD на фибрилlogenез лизоцима куриного яйца.

Мы исследовали взаимодействие лизоцима с пептидом NTQATNRNTD (далее - HALF), являющимся половиной зеркально-симметричной структуры в последовательности этого белка. В рамках предположения о роли зеркально-симметричных мотивов в межмолекулярных взаимодействиях, определяющих ранние стадии фибрилlogenеза, такой пептид должен взаимодействовать с зеркально-симметричным мотивом бета-домена лизоцима куриного яйца и таким образом оказывать влияние на динамику образования фибрилл лизоцима и их морфологические характеристики (см. рис. 3.40).

Подбор условий для фибрилlogenеза лизоцима. В качестве начальных условий для фибрилlogenеза лизоцима мы использовали условия, описанные в работе (Arnaudov, de Vries, 2005). Мы использовали концентрации 14, 10, 8, 5, 4 мг/мл.

Фибрилlogenез детектировали с помощью измерения флуоресценции тиофлавина Т и с помощью электронной микроскопии. При концентрации 14 мг/мл на пятый день в пробирке, где происходила инкубация, наблюдали образование геля, добавление которого в буфер, содержащий тиофлавин Т, вызывало увеличение флуоресценции этого красителя. Результаты электронной микроскопии представлены на рисунке 3.41.

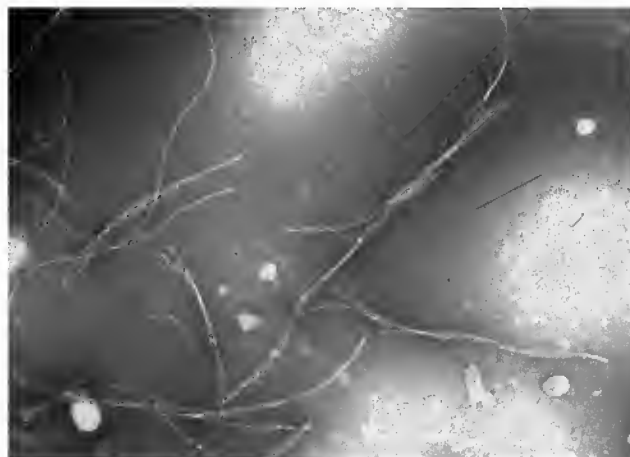


Рисунок 3.41. Результаты электронной микроскопии лизоцима в концентрации 14 мг/мл, инкубировавшегося в растворе для фибрилlogenеза в течение 5 дней.

Толщина фибриллярных агрегатов составила 6-8 нм, длина – до 1 мкм. Сопоставляя полученные результаты с литературными данными (Sunde et al., 1997), мы сделали заключение, что наблюдаются протофиламенты белка.

В дальнейших экспериментах мы установили, что минимальная концентрация лизоцима, необходимая для фибрилlogenеза в используемых условиях, составляет 5 мг/мл.

Образование комплекса лизоцима с пептидом HALF. Для исследования роли зеркально-симметричного мотива лизоцима в начальных этапах фибрилlogenеза, мы провели инкубацию лизоцима в минимальной фибрилlogenной концентрации совместно с десятикратным мольным избытком пептида HALF. Инкубацию проводили в течение времени, недостаточного для образования фибрилл (около 2 часов). В качестве контроля использовали такую же пробу без добавления пептида. Результаты

электрофореза в кислых условиях представлены на рисунке 3.42. Различие электрофоретической подвижности образцов свидетельствует в пользу образования комплекса между лизоцимом и пептидом.

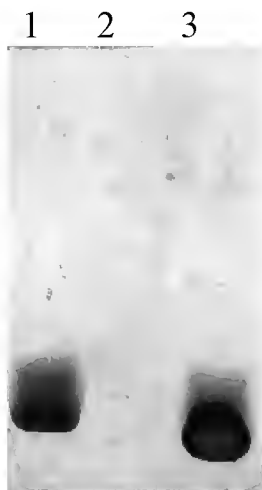


Рисунок 3.42. Результаты электрофореза в кислых условиях лизоцима, инкубировавшегося в условиях для фибриллогенеза в присутствии (дорожка 1) и в отсутствие (дорожка 3) пептида HALF. На дорожку 2 был нанесен пептид в концентрации, присутствующей в пробе.

Докинг пептида и молекулы лизоцима. Для определения сайта присоединения пептида HALF к молекуле лизоцима, мы провели компьютерное моделирование взаимодействия лизоцима и пептида. Результаты моделирования свидетельствовали о том, что наиболее энергетически выгодным расположением молекулы пептида является расположение вблизи зеркально-симметричного мотива (рисунок 3.43). Присоединение молекулы пептида приводило к возникновению стерического препятствия вблизи ферментативного центра белка (Филлипс, 1968). Мы сделали предположение, что в случае соответствия экспериментов *in vitro* и *in silico* в присутствие пептида должно наблюдаться снижение ферментативной активности белка.

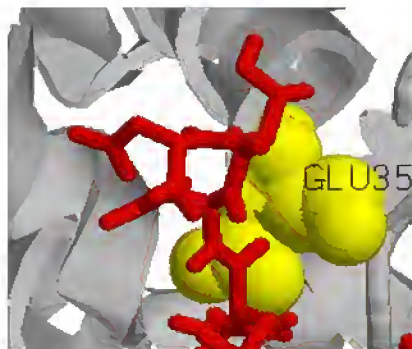


Рисунок 3.43. Результаты докинга молекул лизоцима и пептида. Красным цветом выделен фрагмент пептида HALF, желтым – ферментативный центр этого белка.

Влияние пептида HALF на ферментативную активность лизоцима. При проведении эксперимента по изучению влияния пептида на ферментативную активность лизоцима мы наблюдали, что в присутствии десятикратного мольного избытка пептида снижается скорость гидролиза препарата стенок *M.luteus*.. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.44. Факт снижения ферментативной активности лизоцима косвенно свидетельствует в пользу наличия способности такого пептида присоединяться к зеркально-симметричному участку молекулы лизоцима.

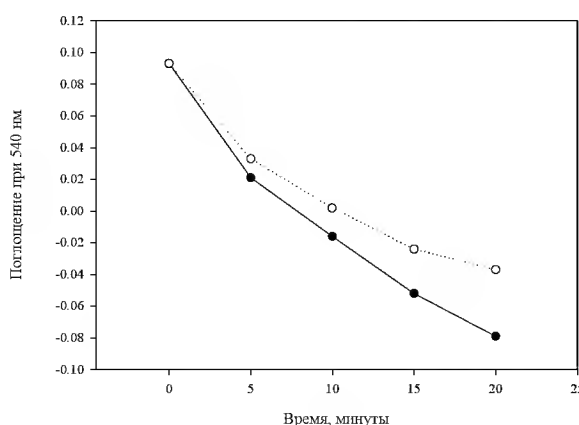


Рисунок 3.44. Влияние пептида HALF на ферментативную активность лизоцима. Непрерывная линия – белок в оптимальной концентрации, прерывистая – белок в той же концентрации в присутствии пептида.

Изучение влияния пептида на фибрилlogenез лизоцима. В предварительных экспериментах с использованием методов атомной силовой микроскопии и изучения флюоресценции тиофлавина Т мы установили, что пептид HALF не способен образовывать фибриллы в концентрациях 0.1 – 5 мг/мл при значениях pH 2, 2.4, 6 и 7.4. (Данные не представлены).

На рисунке 3.45 (А) представлены результаты электронной микроскопии фибрилл лизоцима. На рисунке 3.45 (В) представлены результаты электронной микроскопии фибрилл лизоцима, образовавшихся в присутствии 10 – кратного мольного избытка (5 мг/мл) пептида. Пептид HALF в концентрации 5 мг/мл, инкубированный в условиях для фибрилlogenеза лизоцима, не был способен к образованию фибрилл (данные не представлены).

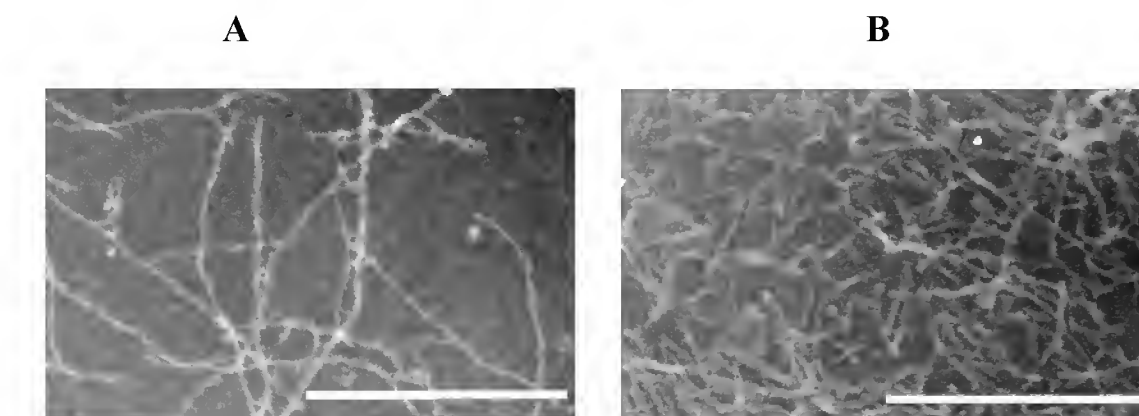


Рисунок 3.45. Фибриллы, образовавшиеся в отсутствие (А) и в присутствии (В) пептида. Длина серого прямоугольника соответствует 0.7 мкм.

Диаметр фибрилл, образовавшихся в присутствии пептида (около 10 нм), не отличался от диаметра фибрилл контрольного образца. Это свидетельствует о сходстве олигомерных структур, образующих фибриллы в присутствии и отсутствие пептида. Однако наблюдались отличия в плотности расположения фибрилл на подложке ($10 \pm 5 \text{ мкм}^{-2}$ в контрольном образце и $30 \pm 10 \text{ мкм}^{-2}$ в присутствии пептида) и в средней длине фибрилл ($700 \pm 100 \text{ нм}$ в контрольном образце, $300 \pm 50 \text{ нм}$ в присутствии пептида). Важно отметить, что при электронной микроскопии фибрилл лизоцима, образовавшихся в отсутствие пептида, не наблюдали структур, сходных с представленными на рисунке 3.45

(В). Это свидетельствует о том, что наблюдаемые морфологические отличия не связаны с неравномерностью сорбции образцов на поверхность подложки.

Фибриллогенез лизоцима в исследованных образцах происходил в условиях, отличающихся только наличием или отсутствием пептида. Образцы для микроскопии готовились одновременно идентичным способом. Наблюдаемые отличия сохранялись при повторном проведении эксперимента, поэтому, исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о влиянии пептида NTQATNRNTD на образование фибрилл лизоцима (Егоров и др., 2006в). Такой пептид может быть использован в качестве основы для разработки эффективного ингибитора фибриллогенеза этого белка.

3.7. Заключение.

Поиск ЗСМ в последовательностях модельных белков альфа-лактальбумина человека и лизоцима куриного яйца позволил определить участки, являющиеся потенциальными фибриллогенными детерминантами этих белков. Пептид GYDTQAIVENNESTEYG (WT), содержащий ЗСМ АЛ человека и GYDTQTVVNNNGHTDYG (ID), содержащий основные элементы ЗСМ этого белка, способны к фибриллогенезу. Пептиды WT и ID способны индуцировать фибриллогенез АЛ. При индукции фибриллогенеза АЛ пептидом ID комплексы АЛ с пептидом отличаются от описанных в литературе токсичных префибрилярных олигомеров альфа-лактальбумина. Пептид NTQATNRNTD (HALF), являющийся половиной ЗСМ лизоцима, способен связываться с этим белком и влияет на его фибриллогенез. Таким образом, ЗСМ в последовательностях альфа-лактальбумина и лизоцима играют роль в фибриллогенезе этих белков. Воздействие на ЗСМ с помощью пептидов является перспективной стратегией борьбы с образованием токсичных олигомеров белков, возникающих в процессе фибриллогенеза.

ВЫВОДЫ

1. При компьютерном анализе первичной структуры семи известных фибрилlogenных пептидов обнаружены зеркально-симметричные мотивы.
2. Зеркально-симметричный мотив в последовательности альфа-лактальбумина человека (GYDTQAIVENNESTEYG) содержит фибрилlogenную детерминанту этого белка.
3. Зеркально-симметричный пептид ID (GYDTQTVVNNNGHTDYG), гомологичный зеркально-симметричному мотиву в последовательности альфа-лактальбумина человека, способен к фибриллогенезу. Фибрилlogenные свойства пептида ID охарактеризованы в экспериментах *in vitro* и *in silico*.
4. Пептид ID способен индуцировать фибриллогенез альфа-лактальбумина человека. Он связывается с альфа-лактальбумином в соотношении 2:1.
5. Постулирован механизм участия зеркально-симметричных мотивов в фибриллогенезе. В соответствии с этим рассчитан и синтезирован пептид, идентичный фрагменту бета-домена лизоцима. Показано влияние такого пептида на морфологию фибрилл лизоцима.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронай Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н., Маскевич А.А., Степура В.И., Поварова О.И., Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Финк А.Л., Уверский В.Н. Спектральные свойства тиофлавина Т и его комплексов с амилоидными фибриллами // Журнал прикладной спектроскопии, 70(6):767-773, 2003;
2. Гармай Ю.П., Егоров В.В. Поиск симметричных мотивов в амилоидогенных белках // Материалы межвузовской научной конференции “XXXIV неделя науки СПбГТУ”, СПб, изд-во СПбГТУ, с. 5, 2005;
3. Гильманин Р.И., Долгих Д.А., Птицын О.Б., Финкельштейн А.В., Шахнович Е.И. Белковые глобулы без уникальной пространственной структуры: экспериментальные данные для α -лактальбуминов и общая модель // Биофизика, 27(6):1005-1015, 1982;
4. Егоров В.В. Особенности первичной структуры амилоидогенных белков // тезисы доклада, 9-я пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века” 18-22 апреля 2005, с.18, 2005б;
5. Егоров В.В. Симметричные аминокислотные последовательности и фибриллогенез // Вестник молодых ученых, Всероссийская конференция молодых исследователей 14-16 апреля 2005 года, Сборник материалов, СПб, с. 37, 2005в;
6. Егоров В.В. Самокомплементарные мотивы в амилоидогенных белках // Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины, Сборник тезисов к научно-практической конференции молодых ученых, СПб, Издательский дом МАПО, с. 391, 2005г;
7. Егоров В.В. Моделирование фибриллогенеза белков // тезисы доклада, 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века” 17-21 апреля 2006, с. 17, 2006а;
8. Егоров В.В., Брилиная Е.С., Гармай Ю.П., Моделирование *in silico* начальных стадий фибриллогенеза зеркально-симметричного пептида // тезисы доклада, Человек и его здоровье, Девятая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей, СПб, с. 107, 2006б

9. *Егоров В.В., Грудина Н.А., Соловьев К.В.* Влияние пептида NTQATNRNTD на аномальный фибриллогенез лизоцима // Исследовано в России, 9:2475-2481, [http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2006/256.pdf2006, 2006в](http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2006/256.pdf2006, 2006в;);
10. *Инге-Вечтомов С.Г.* Прионы дрожжей и центральная догма молекулярной биологии // Вестник Российской Академии наук, 70(4), 2000;
11. *Крындушкин Д., Александров И., Тер-Аванесян М., Кушниров В.* Новый метод анализа структуры прионных агрегатов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* // тезисы доклада, III Конгресс Российского Биохимического Общества, Симпозиум XI, СПб., с. 496, 2002;
12. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия // М.: Мир, 481 с., 1969;
13. *Маскевич А.А., Легеда М.В., Туроверов К.К., Кузнецова И.М.* Флуоресцентные свойства тиофлавина Т при его встраивании в γ -циклодекстрин // Сборник: Молекулярные мембранные и клеточные основы функционирования биосистем, 2:30-32, 2004;
14. *Маурер, Г.* Диск-электрофорез // М.: Мир. с. 60-61, 1971;
15. *Ойфа А.И.* Сенильный церебральный амилоидоз // М.: Медицина, 192 с., 1987;
16. *Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л.* Прионы и прионные болезни // М.: Издательство РАМН, 384 с., 2004;
17. *Соловьев К.В., Гастева А.А., Егоров В.В., Алейникова Т.Д., Сироткин А.К., Шварцман А.Л., Шавловский М.М.* Роль С-концевого фрагмента транзитина человека в аномальном фибриллогенезе // Биохимия 71(5): 672 – 680, 2006;
18. *Туроверов К.К., Бушмарина Н.А., Малова Л.Н., Кузнецова И.М.* Собственная УФ-флуоресценция лизоцима и особенности микроокружения его триптофановых остатков // Биофизика 46(6):978-987, 2001;
19. *Филлипс, Д.* Трехмерная структура молекулы фермента // Молекулы и клетки, 3:9-28, 1968;

20. *Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* Физика белка (курс лекций) // М.: Книжный дом "Университет" , 480 с., 2002;
21. *Шнаков А.О.* Внутренняя симметрия и повторяющиеся последовательности в первичной структуре IRS-белков, эндогенных субстратов рецептора инсулина // Цитология, 40(2/3):210-220, 1998.
- 22.
23. *Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997;
24. *Arnaudov L.N., de Vries R.* Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme // Biophysical J., 88:515-526, 2005;
25. *Atwood C.S., Moir R.D., Huang X., Scarpa R.C., Baccara N.M.E., Romano D.M., Harthorn M.A., Tanzi R.E., Bush A.I.* Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis// The J. Of Biological Chemistry, 273(21):12817-12826, 1998;
26. *Azriel R., Gazit E.* Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide // The J. Of Biological Chemistry, 276(36):34156-34161, 2001;
27. *Bernier V., Lagace M., Bichet D.G., Bouvier M.* Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases// TRENDS In Endocrinology and Metabolism // 15(5):222-227, 2004;
28. *Bitan G., Vollers S., Teplow D.B.* Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid β -protein oligomerization // The J. Of Biological Chemistry, 278(37):34882-34889, 2003;
29. *Booth II D.R., Sundetll M., Bellotti S V., RobinsoW C.V., Hutchinson W.L., Fraser P.E., Dobson C.M., Radford S.E., Blaket C.C.F., Pepys M.B.* Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis // Nature, 385:787-793, 1997;
30. *Bromley E.H.C., Krebs M.R.H., Donald A.M.* Aggregation across the length-scales in β -lactoglobulin // Faraday Discuss, 128:13-27, 2005;

31. *Bucciantini M., Galloni G., Chiti F., Formigli L., Nosi D., Dobson C.M., Stefani M.* Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity // *The J. Of Biological Chemistry*, 279(30):31374-31382, 2004;
32. *Cao A., Hu D., Lai L.* Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme // *Protein Science*, 13:319-324, 2004;
33. *Carulla N., Caddy G.L., Hall D.R., Zurdo J., Gairi M., Feliz M., Giralt E., Robinson C.V., Dobson C.M.* Molecular recycling within amyloid fibrils // *Nature*, 436:554-558, 2005;
34. *Cawthorn K.M., Narayan M., Chaudhuri D., Permyakov E.A., Berliner L.J.* Interactions of α -lactalbumin with fatty acids and spin label analogs // *The J. Of Biological Chemistry*, 272(49):30812-30816, 1997;
35. *Chamberlain A.K., MacPhee C.E., Zurdo J., Morozova-Roche L.A., Hill H.A.O., Dobson C.M., Davis J.J.* Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy // *Biophysical J.*, 79:3282-3293, 2000;
36. *Chang M.H.Y., Hua C.T., Isaac E.L., Litjens T., Hodge G., Karageorgos L.E., Meikle P.J.* Transthyretin interacts with lysosome-associated membrane protein (LAMP-1) in circulation // *Biochem. J.*, 382:481-489, 2004;
37. *Damsbo M., Kinnear B.S., Hartings M.R., Ruhoff P.T., Jarrold M.F., Ratner M.A.* Application of evolutionary algorithm methods to polypeptide folding: comparison with experimental results for unsolvated Ac-(Ala-Gly-Gly)₅-LysH⁺ // *PNAS*, 101(19):7215-7222, 2004;
38. *Demuro A., Mina E., Kaye R., Milton S.C., Parker I., Glabe C.G.* Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers // *The J. Of Biological Chemistry*, 280(17):17294-17300, 2005;
39. *Desnick R.J.* Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases // *J. Inherit. Metab. Dis.*, 27:385-410, 2004;
40. *Dobson C.M.* Protein misfolding, evolution and disease // *TIBS*, 24:329-332, 1999;

41. *Duringer C., Hamiche A., Gustafsson L., Kimura H., Svanborg C.* HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei // *The J. Of Biological Chemistry*, 278(43):42131-42135, 2003;
42. *Egorov V.V., Solovyov K.V.* Peculiarities of fibrillogenic proteins primary structure // *ESHG Prague, Czech Republic, May 7-10, 2005*, p.278, 2005a;
43. ERMM. Expert reviews in molecular medicine, Features of amyloid fibrils. <http://www.expertreviews.com>;
44. *Gaeta A., Hider R.C.* The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy // *British J. of Pharmacology*, 146:1041-1059, 2005;
45. *Gasset M., Baldwin M., Lloyd D., Gabriel J., Holtzman D., Cohen F., Fletterick R., Prusiner S.* Predicted α -helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid // *PNAS*, 89:10940-10944, 1992;
46. *Ghanta J., Shen C.-L., Kiessling L.L., Murphy R.M.* A strategy for designing inhibitors of β -amyloid toxicity // *The J. of Biological Chemistry*, 271(47):29525-29528, 1996;
47. *Gibson T.J., Murphy R.M.* Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides // *Protein Sci.*, 15(5):1133-41, 2006;
48. *Goers J., Permyakov S.E., Uversky V.N., Fink A.L.* Conformational prerequisites for α -lactalbumin fibrillation // *Biochemistry*, 41:12546-12551, 2002;
49. *Grobler J.A., Rao K.R., Brew K.* Sequences of two highly divergent canine type c lysozymes: implications the evolutionary origins of the lysozyme/ α -lactalbumin superfamily // *Arch. Biochem. Biophys.*, 313(2):360-366, 1994;
50. GROMACS. Пporпamma: <http://www.gromacs.org/>;
51. *Hakansson A., Svensson M., Mossberg A.-K., Sabharwal H., Linse S., Lazou I., Lonnerdal B., Svanborg C.* A folding variant of α -lactalbumin with bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* // *Molecular Microbiology*, 35(3):589-600, 2000;
52. *Hall L., Craig R.K., Edbrooke M.R., Campbell P.N.* Comparison of the nucleotide sequence of cloned human and guinea-pig pre- α -lactalbumin cDNA

- with that of chick pre-lysozyme cDNA suggests evolution from a common ancestral gene // *Nucleic Acids Research*, 10(11):3503-3515, 1982;
53. *Hall D., Hirota N., Dobson C.M.* A toy model for predicting the rate of amyloid formation from unfolded protein // *J. Mol. Biol.*, 195:195-205, 2005;
 54. *Hamada D., Dobson C.M.* A kinetic study of β -lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea // *Protein Science*, 11:2417-2426, 2002;
 55. *Hammarstorm P., Persson M., Freskgard P.-O., Martensson L.-G., Andersson D., Jonsson B.-H., Carlsson U.* Structural mapping of an aggregation nucleation site in a molten globe intermediate // *The J. of Biological Chemistry*, 274(46): 32897-32903, 1999;
 56. *Hamodrakas S.J., Hoenger A., Iconomidou V.A.* Amyloid fibrillogenesis of silkworm chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase // *J. Of Structural Biology*, 145:226-235, 2004;
 57. HEX <http://www.csd.abdn.ac.uk/hex/>;
 58. *Horwich A.* Protein aggregation in disease: role for folding intermediates forming specific multimeric interactions // *The J. of Clinical Investigations*, 110(9):1221-1232, 2002;
 59. *Jakobson D.R.* Amyloidosis, Overview // <http://www.emedicine.com/>;
 60. *Jaroniec C.P., MacPhee C.E., Astrof N.S., Dobson C.M., Griffin R.G.* Molecular conformation of a peptide fragment of transthyretin in an amyloid fibril // *PNAS*, 99(26):16748-16753, 2002;
 61. *Jarvis J.A., Craik D.J., Wilce M.C.* X-ray diffraction studies of fibrils formed from peptide fragments of transthyretin // *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 192:991-998, 1993;
 62. *Jimenez J.L., Nettleton E.J., Bouchard M., Robinson C.V., Dobson C.M., Saibil H.R.* The protofilament structure of insulin amyloid fibrils // *PNAS*, 99(14):9196-9201, 2002;
 63. *Kamatari Y., Yamada H., Akasaka K., Jones J., Dobson C., Smith L.* Response of native and denatured hen lysozyme to high pressure studied by $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR spectroscopy // *Eur. J. Biochem.* 268:1782-1793, 2001;

64. Kim T.D., Paik S.R., Yang C.-H., Kim J. Structural changes in α -Synuclein affect its chaperone-like activity *in vitro* // Protein Science, 9:2489-2496, 2000;
65. Kim Y.-S., Randolph T.W., Manning M.C., Stevens F.J., Carpenter J.F. Congo red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance aggregation and amyloid fibril formation // The J. Of Biological Chemistry, 278(12):10842-10850, 2003;
66. Kohler C., Gogvadze A., Hakansson A., Svanborg C., Orrenius S., Zhivotovsky B. A folding variant of human α -lactalbumin induces mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria // Eur. J. Biochem., 268:186-191, 2001;
67. Koo E.H., Lansbury P.T., Kelly J.W. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9989-9990, 1999;
68. Krebs M.R.H., Wilkins D.K., Chung E.W., Pitkeathly M.C., Chamberlain A.K., Zurdo J., Robinson C.V., Dobson C.M. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and peptide fragment from the β -domain // J. Mol. Biol., 300:541-549, 2000;
69. Krebs M.R.H., MacPhee C.E., Miller A.F., Dunlop I.E., Dobson C.M., Donald A.M. The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin // PNAS, 101(40):14420-14424, 2004a;
70. Krebs M.R.H., Morozova-Roche L.A., Daniel K., Robinson C.V., Dobson C.M. Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils // Protein Science, 13:1933-1938, 2004b;
71. Krebs M.R.H., Bromley E.H.C., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications // J. of Structural Biology, 149:30-37, 2005a;
72. Krebs M.R.H., Bromley E.H.C., Rogers S.S., Donald A.M. The mechanism of amyloid speherulite formation by bovine insulin // Biophysical J., 88:2013-2021, 2005b;

73. *Kumagai I., Kuwajima K.* Effects of amino acid substitutions in the hydrophobic core of α -lactalbumin on the stability of the molten globe state // *Protein Eng.*, 8(11):1153-1161, 1995;
74. *Kuroki R., Taniyama Y., Seko C., Nakamura H., Kikuchi M., Ikehara M.* Design and creation of a Ca^{2+} binding site in human lysozyme to enhance structural stability // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry*, 86:6903-6907, 1989;
75. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 227:680-685, 1970;
76. *Lansbury P.T., Jr.* Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us more about fibrillogenesis and disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3342-3344, 1999;
77. *Laureto P.P. de., Frare E., Battaglia F., Mossuto M.F., Uversky V.N., Fontana A.* Protein dissection enhances the amyloidogenic properties of α -lactalbumin // *FEBS J.*, 272(9):2176, 2005;
78. *Legman G., Baskalov I.V., Nguyen H.-O. B., Riesner D., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B.* Synthetic Mammalian Prions // *Science*, 305:673-676, 2004;
79. *Leissring M.A., Lu A., Condrón M.M., Teplow D.B., Stein R.L., Farris W., Selkoe D.J.* Kinetics of amyloid β -protein degradation determined by novel fluorescence- and fluorescence polarization-based assays // *The J. Of Biological Chemistry*, 278(39):37314-37320, 2003;
80. *LeVine H, III.* Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: detection of Amyloid aggregation in solution // *Protein Science*, 2:404-410, 1993;
81. *LeVine H, III.* Thioflavin T interaction with amyloid β -sheet structures // *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, 2:1-6, 1995;
82. *Liu W., Prausnitz J.M., Blanch H.W.* Amyloid fibril formation by peptide LYS (11-36) in aqueous trifluoroethanol // *Biomacromolecules*, 5:1818-1823, 2004;
83. *Lomakin A., Teplow D.B., Kirschner D.A., Benedek G.B.* Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7942-7947, 1997;

84. *Lopez de la Paz M., Goldie K., Zurdo J., Lacroix E., Dobson C.M., Hoenger A., Serrano L.* De novo designed peptide-based amyloid fibrils // PNAS, 99(25):16052-16057, 2002;
85. *Luhrs T., Ritter C., Adrian M., Riek-Loher D., Bohrmann B., Dobeli H., Schubert D., Riek R.* 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1– 42) fibrils // PNAS, 102(48):17342–17347, 2005;
86. *Makin O.S., Atkins E., Johanson J., Serpell L.C.* Molecular basis for amyloid fibril formation and stability // PNAS, 102(2):315-320, 2005;
87. *MacPhee C.E., Dobson C.M.* Chemical dissection and reassembly of amyloid fibrils formed by a peptide fragment of transthyretin // J. Mol.Biol. 297:1203-1215, 2000;
88. *Malisauskas M., Darinskas A., Zamotin V.V., Gharibyan A., Kostanyan I.A., Morozova-Roche L.A.* Intermediate amyloid oligomers of lysozyme: is there cytotoxicity a particular case or general rule for amyloid // Biochemistry (Moscow), Papers in press, Published on feb. 26, 2006 as manuscript BM05-230, 2006;
89. *Massi F., Klimov D., Thirumalai D., Straub J.E.* Charge states rather than propensity for β -structure determine enhanced fibrillogenesis in wild-type Alzheimer's β -amyloid peptide compared to E22Q Dutch mutant // Protein Science 11:1639-1647, 2002;
90. *Matsuda J., Suzuki O., Oshima A., Yamamoto Y., Noguchi A., Takimoto K., Iton M., Matsuzaki Y., Yasuda Y., Ogawa S., Sakata Y., Nanba E., Higaki K., Ogasawa Y., Tominada L., Ohno K., Iwasaki H., Watanabe H., Brady R.O., Suzuki Y.* Chemical chaperone therapy for brain pathology in G_{M1} –gangliosidosis // PNAS, 100(26):15912-15917, 2003;
91. *McAllister C., Karymov M.A., Kawano Y., Lushnicov A.Y., Mikheikin A., Uversky V.N., Lyubchenko Y.L.* Protein interactions and misfolding analyzed by AFM force spectroscopy // J. Mol. Biol., 354(5):1028-1042, 2005;
92. *Merlini G., Bellotti V.* Molecular mechanisms of Amyloidosis // N. Engl. J. Med., 349:583-596, 2003;

93. *Merlini G., Bellotti V.* Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding // *Clin. Chim. Acta*, 357(2):168-172, 2005;
94. *Mitraki A., van Raaij M.J.* Folding of β -structured fibrous proteins and self-assembling peptides // *Proteins Nanotechnology*, 300:125-140, 2005;
95. NCBI. База данных: <http://www.ncbi.nih.gov/genbank> ;
96. *Nelson R., Sawaya M., Balbirnie M., Madsen O., Riekel C., Grothe R., Eisenberg D.* Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils // *Nature*, 435:doi:10.1038, 2005;
97. *Nitta K., Sugai S.* The evolution of lysozyme and α -lactalbumin // *Eur. J. Biochem.*, 182(1):111-118, 1989;
98. *Norstrom E.M., and Mastrianni J.A.* The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrP^{Sc}-PrP^C complex that leads to prion propagation // *The J. Of Biological Chemistry*, 280(29):27236–27243, 2005;
99. OMIMLYZ (Online Mendelian Inheritance in Men) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=153450>;
100. OMIMTTR (Online Mendelian Inheritance in Men) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=176300>;
101. *Opazo C., Huang X., Cherny R.A., Moir R.D., Rocher A.E., White A.R., Cappai R., Masters C.L., Tanzi R.E., Inestrosa N.C., Bush A.I.* Mettaloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid // *The J. Of Biological Chemistry*, 277(43):40302-40308, 2002;
102. *Parry R. M., Jr, Chandan R. C., Shahani K. M.* A rapid and sensitive assay of muramidase // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119:384-386, 1965;
103. *Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C.F., Terry C.J., Feast T.G., Zalin T.G., Hsuan J.J.* Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic Amyloidosis // *Nature*, 362:553-556, 1993;
104. *Permyakov E.A., Berliner L.J.* α -lactalbumin: structure and function // *FEBS Letters*, 473:269-274, 2000;

105. *Permyakov S.A., Pershikova I.V., Zhadan A.P., Goers J., Bakunts A.G., Uversky V.N., Berliner L.J., Permyakov E.A.* Conversion of human α -lactalbumin to an Apo-like state in the complexes with basic poly-amino acids: toward understanding of the molecular mechanism of antitumor action of HAMLET // *J. of Proteome Research*, 4:564-569, 2005;
106. *Polverino de Laureto P., Vinante D., Scaramella E., Frare E., Fontana A.* Stepwise proteolytic removal of the β subdomain in α -lactalbumin. The protein remains folded and can form the molten globule in acid solution // *Eur. J. Biochem.*, 269:1-11, 2001;
107. *Polverino de Laureto P., Frare E., Gottardo R., van Dael H., Fontana A.* Partly folded states of members of the lysozyme/lactalbumin superfamily: a comparative study by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis // *Protein Science*, 11:2932-2946, 2002;
108. *Prager E.M., Wilson A.C.* Ancient origin of lactalbumin from lysozyme: analysis of DNA and amino acid sequences // *J. Mol. Evol.*, 27(4):326-335, 1988;
109. *Quintas A., Vaz D.C., Cardoso I., Saraiva M.J.M., Brito R.M.M.* Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants // *The J. of Biological Chemistry*, 276(29):27207-27213, 2001;
110. *Reixach N., Deechongkit S., Jiang X., Kelly J.W., Buxbaum J.N.* Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture // *PNAS*, 101(9):2817-2822, 2004;
111. *Ritchie D.W., Kemp G.J.L.* Protein docking using spherical polar fourier correlations // *PROTEINS: Struct. Funct. Genet.*, 9:178-194, 2000;
112. *Ryadnov M.G., Woolfson D.N.* Engineering the morphology of a self-assembling protein fibre // *Nature materials*, 2:329, 2003;
113. *Sakurai K., Oobatake M., Goto Y.* Salt-dependent monomer-dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3 // *Protein Science*, 10:2325-2335, 2001;

114. *Sedman V.L., Allen S., Chan W.C., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M.* Atomic Force microscopy of human amylin (20-29) fibrils // *Protein and Peptide Letters*, 12:79-83, 2005;
115. *Selkoe D.J.* Folding proteins in fatal ways // *Nature*, 426:900-904, 2003;
116. *Serpell L.C., Sunde M., Benson M.D., Tennent G.A., Pepys M.B., Fraser P.E.* The protofilament substructure of amyloid fibrils // *J. Mol. Biol.* 300:1033-1039, 2000;
117. *Shewale J.G., Sinha S.K., Brew K.* Evolution of α -lactalbumins // *The J. Of Biological Chemistry*, 259(8):4947-4956, 1984;
118. *Shucla U.J., Marino H., Huang P.-S., Mayo S.L., Love J.J.* A designed protein interface that blocks fibril formation // *J. Am. Chem. Soc.*, 126:13914-13915, 2004;
119. SMMP. Программа: http://www.phy.mtu.edu/biophys/smmp_form.htm;
120. *Sousa M.M., Cardoso I., Fernandes R., Guimaraes A., Saraiva M.J.* Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy. Evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates // *American J. of Pathology*, 159(6):1993-2000, 2001;
121. *Srisailam S., Kumar T.K.S., Rajalingam D., Kathir K.M., Sheu H.-S., Jan F.-J., Chao P.-C., Yu C.* Amyloid-like fibril formation in an all β -barrel protein // *The J. of Biological Chemistry*, 278(20):17701-17709, 2003;
122. *Stopa B., Piekarska B., Konieczny L., Rybarska J., Spolnic P., Zemanec G., Roterman I., Krol M.* The structure and protein binding of amyloid-specific dye reagents // *Acta Biochimica Polonica*, 50(4):1213-1227, 2003;
123. *Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C.F.* Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron x-ray diffraction // *J. Mol. Biol.*, 273:729-739, 1997;
124. *Svensson M., Sabharwal H., Hakansson A., Mossberg A.-K., Lipniunas P., Leffler H., Svanborg C., Linse S.* Molecular characterization of α -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells // *The J. of Biological Chemistry*, 274(10):6388-6396, 1999;

125. *Svensson M., Hakansson A., Mossberg A.K., Linse S., Svanborg C.* Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis // PNAS, 97(8):4221-4226, 2000;
126. SWISSPROT. База данных: <http://au.expasy.org/>;
127. *Tagliavini F., Prelli F., Verga L., Giassone G., Sarma R., Goveric P., Ghetti B., Passerini F., Ghibaudi E., Forloni G., Salmona M., Bugiani O., Frangione.* Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci., 90:9678-9682, 1993;
128. *Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res., 25:4876-4882, 1997;
129. TINKER. Программа: <http://dasher.wustl.edu/tinker/>;
130. *Velikov P.G.* Kinetics and mechanisms of protein crystallization at the molecular level // Proteins Nanotechnology, 300:15-52, 2005;
131. *Ventura S.* Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility // Microbial cell factories, <http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/11>, 2005;
132. *Villoutreix B.O.* Structural Bioinformatics: methods, concepts and applications to blood coagulation proteins // Current Medicinal Chemistry, www.bentham.org, 2001;
133. *Wang W., Hecht M.H.* Rationally designed mutations convert de novo amyloid-like fibrils into monomeric β -sheet proteins // PNAS, 99(5):2760-2765, 2002;
134. *Woo P.* AA Amyloidosis // Arthritis Research Campaign, No. 8 www.arc.org.uk, 1996;
135. *Xu M., Ermolenkov V.V., He W., Uversky V.N., Fredriksen L., Lednev I.K.* Lysozyme fibrillation: deep UV raman spectroscopic characterization of protein structural transformation // Biopolymers, 79:58-61, 2005a;
136. *Xu M., Sugiura Y., Nagaoka S., Kanamaru Y.* Involvement of SDS-stable higher M_r forms of bovine normal milk α -lactalbumin in inducing intestinal IES-6 cell death // Boisci. Biotechnol. Biochem., 69(6):1189-1192, 2005b;

137. *Yagi H., Kusaka E., Hongo K., Mizobata T., Kawata Y.* Amyloid fibril formation of α -synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins // *The J. Of Biological Chemistry*, 280(46):38609-38616, 2005;
138. *Zandomenighi G., Krebs M.R.H., Mccammon M.G., Fandrich M.* FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils // *Protein Science*, 13:3314-3321, 2004;
139. *Zekanowski C., Religa D., Graff C., Filipek S., Kuznicki J.* Genetic aspects of Alzheimer's disease // *Acta Neurobiol Exp.*, 64:19-31, 2004;
140. *Zhang S., Holmes T., Lockshin C., Rich A.* Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3334-3338, 1993;